

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Estudio de los mecanismos que regulan la re-especificación celular
y la pérdida de la capacidad proliferativa en respuesta al daño en
el disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster*.**

Memoria presentada por:

Sara Ahmed de Prado

Licenciada en Biología, para optar al título de

Doctor en Biociencias Moleculares

Madrid, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Estudio de los mecanismos que regulan la re-especificación celular y la pérdida de la capacidad proliferativa en respuesta al daño en el disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster*.

Tesis Doctoral presentada por:

Sara Ahmed de Prado, Licenciada en Biología

Director de la Tesis Doctoral:

Dr. Antonio Baonza Cuenca

Tutor de la tesis Doctoral:

Dr. Carlos Estella Sagrado

Tesis doctoral realizada en el Programa de Homeóstasis de Tejidos y Organogénesis. Unidad de Especificación, Reprogramación y Regeneración del Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’ (CBMSO)

Madrid, 2021

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Plasticidad de tejidos	13
1.2. Regeneración	13
1.3. Pérdida de la capacidad regenerativa.....	15
2. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema modelo genético en estudios de desarrollo y regeneración	16
3. El desarrollo del disco imaginal de ala en <i>Drosophila</i>	18
4. Los discos imaginales como modelo en estudios de regeneración	19
4.1. Procesos regenerativos en los discos imaginales.....	20
4.2. Respuesta sistémica durante la regeneración de los discos imaginales	22
4.3. Pérdida de la capacidad regenerativa en los discos imaginales.....	22
5. Regulación del ciclo celular en el disco de ala.....	24
5.1. Proliferación celular en el disco imaginal de ala durante el desarrollo larvario....	24
5.2. Proliferación celular en el disco imaginal de ala durante el desarrollo pupal	25
5.2.1. Función de los genes reguladores del ciclo celular en el disco de ala durante el desarrollo pupal	26
5.2.2. Regulación epigenética de los genes que controlan la proliferación celular durante el desarrollo pupal.....	27
5.2.3. Función de la hormona Ecdisona en el control de la proliferación celular durante el desarrollo pupal	28
6. El disco imaginal de ala como modelo en estudios de proliferación inducida por apoptosis .	29
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35

1. Cultivo y mantenimiento de <i>Drosophila melanogaster</i>	36
2. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i>	36
3. Protocolo de sobre-expresión en larva.....	37
4. Protocolo de ablación genética en pupa.....	37
5. Irradiación con rayos X de pupas	39
6. Tinciones inmunohistoquímicas	39
7. Análisis por microscopía y procesamiento de imágenes.....	40
8. Cálculo del índice mitótico en discos imaginales	40
9. Análisis estadístico	40

RESULTADOS 43

1. PÉRDIDA DE LA ESPECIFICACIÓN CELULAR TRAS INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN DISCOS IMAGINALES DE ALA LARVARIOS: PAPEL DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN JNK Y JAK/STAT.....45

- 1.1. Análisis de la contribución de las rutas JNK y JAK/STAT a la pérdida de especificación celular en el disco imaginal de ala.45
- 1.2. La activación de la ruta JNK bajo el control de **en-Gal4** durante 24 h se restringe principalmente al compartimento posterior.50
- 1.3. La pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular inducida por JNK es parcialmente independiente de su función apoptótica.....51
- 1.4. La pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular inducida por JNK es dependiente de Dronc.55
- 1.5. La re-especificación celular inducida por las rutas JNK y JAK/STAT es independiente del papel del morfógeno Dpp en la determinación del patrón del ala.57

2. PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR APOPTOSIS EN DISCOS IMAGINALES DE ALA TRAS LA METAMORFOSIS.....60

- 2.1. Caracterización del patrón de división celular en discos imaginales de ala de pupa tras la inducción de apoptosis
- 2.2. Posible papel de Ciclina E como factor limitante de la proliferación inducida por apoptosis en pupa.....66
- 2.3. Caracterización del patrón de activación de JNK tras la inducción de apoptosis en los discos imaginales de ala de pupa.....71
- 2.4. Requerimiento funcional de la ruta JNK durante la proliferación celular inducida

por apoptosis en los discos de ala de pupa tempranos	73
DISCUSIÓN	77
1. RE-ESPECIFICACIÓN CELULAR TRAS INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN LARVA....	79
1.1. La ruta JAK/STAT media la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK.	79
1.2. La pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular inducida por JNK es parcialmente independiente de su función apoptótica, pero dependiente de Dronc.	82
1.3. La re-especificación celular inducida por la ruta JNK es independiente de la señalización por Dpp durante el desarrollo.....	83
2. PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR APOPTOSIS EN PUPA	83
2.1. La inducción de apoptosis antes de las 24h DFP induce proliferación celular hasta las 30 h DFP.	83
2.2. La inducción de apoptosis después de las 24h DFP no induce proliferación celular.....	87
2.3. Respuesta apoptótica tras la irradiación de los discos imaginales de ala DFP ...	88
2.4. Papel de la ruta JNK en la proliferación inducida por apoptosis en discos imaginales de ala DFP	89
CONCLUSIONES.....	91
BIBLIOGRAFÍA.....	95
ANEXO	115



RESUMEN

La homeóstasis y regeneración son procesos que juegan un papel fundamental en los organismos multicelulares para hacer frente a lesiones o condiciones de estrés que pueden incrementar la muerte celular.

Para poder re-establecer el número y tipo de células que forman una estructura que ha sido dañada es necesario que se produzcan tanto cambios de especificidad celular, como un incremento de la proliferación celular. Establecer cómo se regulan y controlan estos procesos celulares es fundamental para comprender el fenómeno de la regeneración. En este trabajo hemos estudiado los mecanismos genéticos que regulan los cambios de especificación celular y la activación de la proliferación asociados a procesos regenerativos durante el desarrollo. Para ello, hemos utilizado los discos imaginales de *Drosophila melanogaster* como sistema modelo biológico. Estas estructuras son los primordios de los elementos cuticulares del adulto.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis nos han servido para identificar que las rutas de la JNK y JAK/STAT tienen una función cooperativa para promover la re-especificación celular tras la inducción de un daño. Nuestros datos indican que la activación ectópica de la ruta JNK es suficiente para inducir la pérdida autónoma y no autónoma de marcadores de especificidad celular y que el efecto no autónomo depende de la caspasa iniciadora Dronc.

Por otro lado, en esta tesis hemos definido en qué momento del desarrollo se pierde la capacidad de inducir proliferación compensatoria como consecuencia de un daño, y qué mecanismos están involucrados en esta pérdida. Nuestros resultados muestran que en estadios tardíos del desarrollo pupal, a diferencia de lo que ocurre en estadios larvarios, la inducción de daño no es suficiente para re-activar la función de la Ciclina E (CycE) y por lo tanto inducir la re-entrada en el ciclo celular y la división celular. Cuando de forma simultánea se induce daño y se activa la expresión de *cycE* encontramos que las células pueden dividirse incluso en estadios en los que ha cesado el proceso proliferativo de los discos. De esta manera, proponemos que CycE podría ser un factor limitante para la activación de la proliferación inducida por apoptosis en estadios tardíos del desarrollo.

Homeostasis and regeneration are processes that play a fundamental role in multicellular organisms to restore or replace organ and tissues that have been damaged or after a stress conditions that can increase cell death.

In order to re-establish the number and cell types that form a structure that has been damaged, it is necessary to produce both changes in cell specificity and an increase in cell proliferation. Define how these cellular processes are regulated and controlled is essential for understanding the phenomenon of regeneration. In this work, we have studied the genetic mechanisms that regulate changes in cell identity and the activation of proliferation during regeneration. To this end, we have used the imaginal discs of *Drosophila melanogaster* as a biological model system. These structures are the primordia of the cuticular elements of the adult.

The results obtained in this thesis have allowed us to define a cooperative function of the JNK and JAK/STAT signalling pathways in promoting cell re-specification after the induction of damage. Our data indicate that the ectopic activation of the JNK signalling pathway is sufficient for inducing the loss of markers of cell fate commitment, both autonomous and non-autonomously. Interestingly we have found that the non-autonomous effects depend on the function of the initiator caspase, Dronc.

In addition, in this thesis we have defined at what point during development the induction of damage is not sufficient for promoting compensatory proliferation. Moreover we have identified the factors involved in the lost of that ability. Our results show that in late stages of pupal development, unlike what occurs in larval stages, the induction of damage is not enough to re-activate the function of Cyclin E (CycE) and therefore induce re-entry in the cell cycle. Interestingly we found that compensatory proliferation can be restored in late stages of the development when *cycE* is ectopically over-expressed at the same time that damaged is induced. Thus, we propose that CycE might be a limiting factor for the activation of apoptosis-induced proliferation in late stages of development.



ABREVIATURAS

%: Tanto por ciento	Dpp: Decapentaplegic
A/P: anterior/posterior	Dronc: <i>Death regulator Nedd2-like caspase</i>
A: Anterior	En: <i>engrailed</i>
ADN: Ácido Desoxirribonucleico	FACS: <i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
Ap: apterous	FBS: <i>Fetal Bovine Serum</i>
APC: <i>Anaphase Promoting Complex.</i>	Fig: Figura
Ara: Araucan	GFP: <i>Green Fluorescent Protein</i>
ARN: Ácido Ribonucleico	h: horas
BDSC: Bloomington Drosophila Stock Center	Hh: <i>hedgehog</i>
BSA: <i>Bovine Serum Albumin</i>	IR: irradiado
Cdk: Quinasa dependiente de ciclina	JNK: Quinasa c-Jun N-terminal
Ci: <i>cubitus interruptus</i>	L1-L5: Venas longitudinales 1-5
Cyc: Ciclina	M: Mitosis
D/V: Dorsal/Ventral	min: minutos
Dap: <i>dacapo</i>	N: <i>Notch</i>
Dcp1: <i>Drosophila cleaved caspase 1</i>	Nub: nubbin
DFP: Después de la formación del pupario	°C: Grado centígrado
Diap1: <i>Death-associated inhibitor of apoptosis 1</i>	P: Posterior
	PBS: <i>Phosphate Buffered Saline</i>

Abreviaturas

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

WT: *Wild Type*. Fenotipo silvestre

PH3: Fosfo-Histona 3

y: yellow

Ptc: Patched

Yki: Yorkie

Px: Plexus

RB: proteína del Retinoblastoma

RFP: *Red Fluorescent Protein*

RHG: Reaper, Hid y Grim

RNAi: ARN de interferencia

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Rpr: *reaper*

Sal^{EP/V}: *spalt* (región reguladora)

Stg: String

TRE: Tetradecanoylphorbol acetate
Response Element

TS: termo-sensible

Tub: Tubulina

UAS: *Upstream Activating Sequence*

w: white

Wg: wingless



INTRODUCCIÓN

1. Plasticidad de tejidos

Los organismos multicelulares se caracterizan por disponer de un programa de desarrollo extremadamente bien definido y ordenado. La robustez de este programa ontogenético es crítica para la reproducción y perpetuación de la especie. Sin embargo, para hacer frente a la pérdida de una estructura o un conjunto de células debido a daños físicos, amputaciones o infecciones, hace falta que exista cierta plasticidad. Por ello, la plasticidad es un rasgo intrínseco de la multicelularidad que permite a los organismos mantener la homeostasis. Uno de los ejemplos más claros de plasticidad es la regeneración.

1.2. Regeneración

La regeneración se define como la sustitución o reparación de una estructura perdida o lesionada tras un daño, con la forma, tamaño y función originales. Dentro del término regeneración se engloban fenómenos que van desde la cicatrización de una herida, la continua renovación celular de un epitelio (regeneración fisiológica) hasta la reconstrucción de un órgano o una extremidad amputada (regeneración reparativa) (Iismaa et al., 2018). La regeneración es un rasgo ampliamente conservado entre los metazoos que se distribuye al azar entre cada taxón y que puede darse a varios niveles de organización biológica, desde células hasta organismos completos. Así, se han propuesto cinco niveles de organización para describir la regeneración en el reino animal: regeneración celular, tisular, de órganos, estructuras y organismos completos (Bely & Nyberg, 2010; Slack, 2017). La regeneración celular es la recuperación de partes de una célula perdidas tras un daño, como por ejemplo la regeneración de los axones de las neuronas. La regeneración tisular hace referencia al cierre de una herida en una población celular como ocurre por ejemplo tras un corte en un epitelio. La regeneración de órganos se conoce como la recuperación del tamaño de un órgano tras un daño, como por ejemplo el hígado tras una hepatectomía. Se considera regeneración estructural a la regeneración de las extremidades tras una amputación, como se ha visto en artrópodos y vertebrados. Finalmente, la regeneración de un organismo completo a partir de un pequeño fragmento de su cuerpo ocurre por ejemplo en las planarias.

El tipo de células que llevan a cabo la reconstrucción de la estructura dañada varía entre especies e incluso entre tejidos de una misma especie. Las células encargadas de reconstruir la parte dañada pueden ser células madre, como por ejemplo los neoblastos en las planarias (Baguna et al., 1989). En otros casos, como en el pez cebra, tras una lesión en el corazón, un tipo celular específico del corazón, como son los cardiomiocitos, se diferencian y proliferan para dar lugar a más cardiomiocitos que compensen la parte perdida (Jopling et al., 2010; Sánchez-

Iranzo et al., 2018). En otras ocasiones, las células adyacentes a la herida desdiferencian, entran en el ciclo celular y se vuelven a diferenciar en otro tipo celular distinto al original, en un proceso llamado transdiferenciación. Algunos ejemplos de esta capacidad de adquisición de pluripotencia son la regeneración del cristalino del ojo de tritones a partir de las células pigmentarias del iris (Henry & Tsonis, 2010). Otras veces, las células diferenciadas pueden ser estimuladas a dividirse directamente tras un daño originando más células del mismo tipo sin necesidad de desdiferenciarse previamente, como ocurre tras un daño en el hígado (Michalopoulos & DeFrances, 1997). Finalmente, algunas células post-mitóticas diploides diferenciadas responden al daño endociclando dando lugar a células poliploides que aumentan de tamaño y compensan la pérdida de células, como por ejemplo ocurre en la epidermis, el ovario o el intestino grueso de organismos adultos de *Drosophila*. Este proceso se conoce como hipertrofia celular compensatoria (Øvrebø & Edgar, 2018; Tamori & Deng, 2013, 2014).

A principios del siglo XX, Thomas Hunt Morgan propuso la distinción entre dos tipos de modelos regenerativos: morfoláctica y epimórfica (Morgan, 1901; Sunderland, 2010) (Fig. 11). En el modelo de regeneración morfoláctico las células que quedan tras un daño se desdiferenciarían y se reorganizarían para reconstruir la parte perdida. Este proceso ocurriría en ausencia de división celular, lo que daría lugar a una estructura de un tamaño menor que la original. Un ejemplo de regeneración morfoláctica se encuentra en Hidras. Por otro lado el modelo epimórfico implica un incremento de la proliferación celular en la estructura dañada, de manera que se generarían suficientes células para reparar el daño y se recuperaría su tamaño y forma original. Este tipo de crecimiento regenerativo tiene lugar por ejemplo tras amputaciones de extremidades en urodelos, anfibios o las aletas del pez cebra. Recientemente, se ha propuesto que esta distinción es puramente histórica ya que en la mayoría de los eventos regenerativos concurren ambos procesos (Díaz-García & Baonza, 2013).

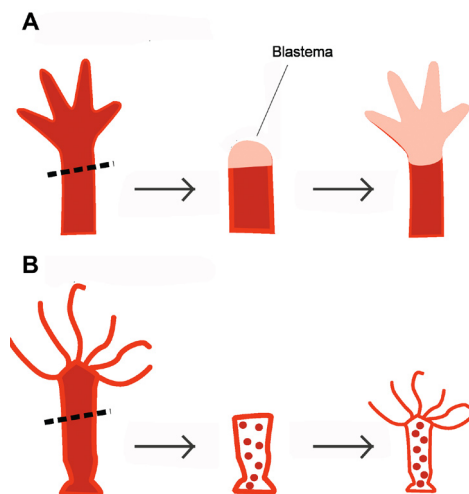


Figura 11. Modelos de regeneración epimórfica y morfoláctica. (A) Tras la amputación de una extremidad, se forma el blastema, un grupo de células indiferenciadas que proliferan para regenerar la parte perdida. (B) No se forma el blastema. La remodelación de los tejidos pre-existentes origina un individuo de menor tamaño. Modificado de (Agata et al., 2007).

1.3. Pérdida de la capacidad regenerativa

La capacidad regenerativa varía no sólo entre diferentes especies, sino también entre diferentes tejidos y diferentes etapas del desarrollo dentro de un mismo organismo. La capacidad regenerativa se ha perdido durante la evolución en la mayoría de los metazoos. Esto podría deberse a que ciertos genes están presentes y son funcionales en las especies con gran capacidad regenerativa, pero están ausentes en las especies que han perdido esta habilidad. Un ejemplo que apoyaría este modelo es el gen *prod1*. Éste es un gen específico de salamandras implicado en la regeneración de las extremidades, que está ausente en el genoma de peces y mamíferos (Garza-Garcia et al., 2010). Otra posibilidad es que en las especies que han perdido la capacidad regenerativa los genes involucrados en procesos regenerativos hayan perdido esa función. Éste sería el caso por ejemplo del gen *fgf20a*, que mientras en el pez cebra su función es necesaria para la regeneración de las aletas, su ortólogo en mamíferos tendría una función completamente diferente (Whitehead et al., 2005). Alternativamente, las diferencias entre las capacidades regenerativas de las distintas especies pueden deberse a que los programas genéticos implicados en la regeneración se activan tras un daño de manera selectiva en las especies con habilidades regenerativas, pero no en las que han perdido esta capacidad. Por ejemplo, tras la amputación de una aleta en el pez cebra, las proteínas JunB son fosforiladas por JNK (Ishida et al., 2010). Sin embargo, las proteínas JunB de mamíferos y *Xenopus laevis* carecen del sitio de fosforilación para JNK (Kallunki et al., 1996).

Diversos estudios han mostrado que la mayoría de los animales tienen una alta capacidad regenerativa durante estadios tempranos del desarrollo, pero que ésta se pierde gradualmente a medida que los animales envejecen o se desarrollan, por ejemplo en *X. laevis* (Yokoyama et al., 2000) o el ratón (Drenckhahn et al., 2008; Janzen et al., 2006). Es posible que la pérdida de la capacidad regenerativa que se produce durante el desarrollo se deba a que se pierde la capacidad de activar los programas genéticos que controlan la regeneración. Por ejemplo, se ha observado que el gen *fgf10* se activa tras la amputación de las extremidades de *X. laevis* durante la etapa regenerativa, pero no cuando se pierde esta capacidad en estadios tardíos del desarrollo. En este sentido, se ha propuesto que la regulación del estado de la cromatina juega un papel crucial bloqueando la expresión de genes durante el desarrollo. De manera, que las regiones reguladoras de algunos genes se encuentran en una conformación que permite su activación en estadios tempranos del desarrollo, pero esta conformación cambia durante el desarrollo, lo que impediría que puedan ser reactivados. Por ejemplo, algunos estudios sugieren que la eliminación de la metilación de histonas en genes clave contribuye a la reactivación de la expresión de genes necesarios durante la regeneración de aletas en peces cebra adultos (Stewart et al., 2009).

Por ultimo, dado que la proliferación celular es un requisito indispensable en todos los procesos

regenerativos que siguen un modelo epimórfico, se ha propuesto que la pérdida de la capacidad regenerativa está asociada con la pérdida de la capacidad proliferativa, como por ejemplo en el corazón del ratón. Un estudio reciente ha encontrado que la expresión del *microARN-128* aumenta en los cardiomiocitos durante la transición del estado proliferativo al post-mitótico. La inhibición del microARN-128 en los cardiomiocitos de ratones adultos activa la expresión de los reguladores CycE y Cdk2, promueve la re-entrada de éstos en el ciclo celular y aumenta la capacidad regenerativa del corazón en respuesta al daño (Huang et al., 2018). De manera similar, se ha descrito que la inhibición de Lrp6 (correceptor de Wnt) (Y. Wu et al., 2020) o la expresión transitoria de ERBB2 (co-receptor de NRG1) (D'Uva et al., 2015) en cardiomiocitos de ratones adultos activa la proliferación celular y promueve la regeneración del corazón en respuesta al daño. Por lo tanto, comprender los mecanismos genéticos y moleculares implicados en la pérdida de la capacidad proliferativa en respuesta al daño a lo largo del desarrollo puede contribuir a entender por qué unos organismos regeneran y otros no.

Se han descrito varios factores asociados a la pérdida de la capacidad proliferativa de las células, como por ejemplo la diferenciación celular (Ruijtenberg & van den Heuvel, 2016; Soufi & Dalton, 2016), el acortamiento de los telómeros producido por la represión de TERT (Guzman et al., 2018), la señalización hormonal (Hirose et al., 2019) o la senescencia celular. Algunos de estos factores, como la diferenciación, conducen al aumento de la expresión de inhibidores del ciclo celular, como RB (Pajcini et al., 2010) o la inhibición de la expresión de los reguladores positivos del ciclo celular, como CycE (Choksi et al., 2006).

2. *Drosophila melanogaster* como sistema modelo genético en estudios de desarrollo y regeneración

Drosophila melanogaster se estableció como organismo modelo en el campo de la genética a principios del siglo XX, cuando el grupo de Thomas Hunt Morgan confirmó la teoría cromosómica de la herencia (Bridges, 1916; Morgan, 1910). Su uso como sistema experimental durante tantos años ha llevado al desarrollo de multitud de herramientas genéticas (Bellen et al., 2004; Matthews et al., 2005; Spradling & Rubin, 1982; Stapleton et al., 2002). Además, el genoma de *Drosophila* fue uno de los primeros en ser secuenciado, existe poca redundancia entre sus genes lo que facilita asociar funciones a genes, y posee un genoma muy compactado, el 5% del tamaño del genoma de mamíferos (Adams et al., 2000). Una de las características más importantes es que la mayoría de los genes y rutas de señalización están evolutivamente conservados entre *Drosophila* y mamíferos (De Velasco et al., 2004; Harvey & Tapon, 2007; Kida et al., 2004; Wangler et al., 2015). De manera que este organismo puede

ser utilizado para establecer las bases de procesos celulares que tienen lugar en humanos. Todas estas herramientas genéticas y características particulares han consolidado a *Drosophila melanogaster* como organismo modelo y han contribuido a descifrar los mecanismos genéticos y moleculares que controlan el desarrollo y el comportamiento celular. Además, este organismo ha servido como modelo para establecer los procesos genéticos que ocurren durante la regeneración. *Drosophila melanogaster* sigue un programa de desarrollo holometábolo (Fig. I2A). La embriogénesis se completa en 24 horas (h) tras la fecundación, y es seguida de tres estadios larvarios separados entre sí por tres mudas de la cutícula. El desarrollo larvario dura 4 días y durante este período las células que forman unas estructuras denominadas discos imaginales proliferan en su interior. Los discos imaginales son estructuras en forma de saco que darán lugar a la mayoría de los elementos cuticulares del adulto, y que se especifican durante la embriogénesis (Fig. I2B) (Bate & Arias, 1991; Cohen et al., 1993; Pastor-Pareja et al., 2004). Tras un período larvario en el que se pueden distinguir tres fases diferentes, se produce un pico de la hormona Ecdisona que induce el comienzo de la fase pupal, que dura aproximadamente 4 días, y el inicio de la metamorfosis (C. K. Mirth & Riddiford, 2007). Durante este proceso la mayoría de los tejidos larvarios son eliminados mediante apoptosis, y se forman las estructuras adultas a partir de los 19 discos imaginales (excepto el abdomen que deriva de los nidos de histoblastos) (Aldaz et al., 2010). Finalmente, el adulto o imago emerge 9-10 días después de la eclosión del huevo.

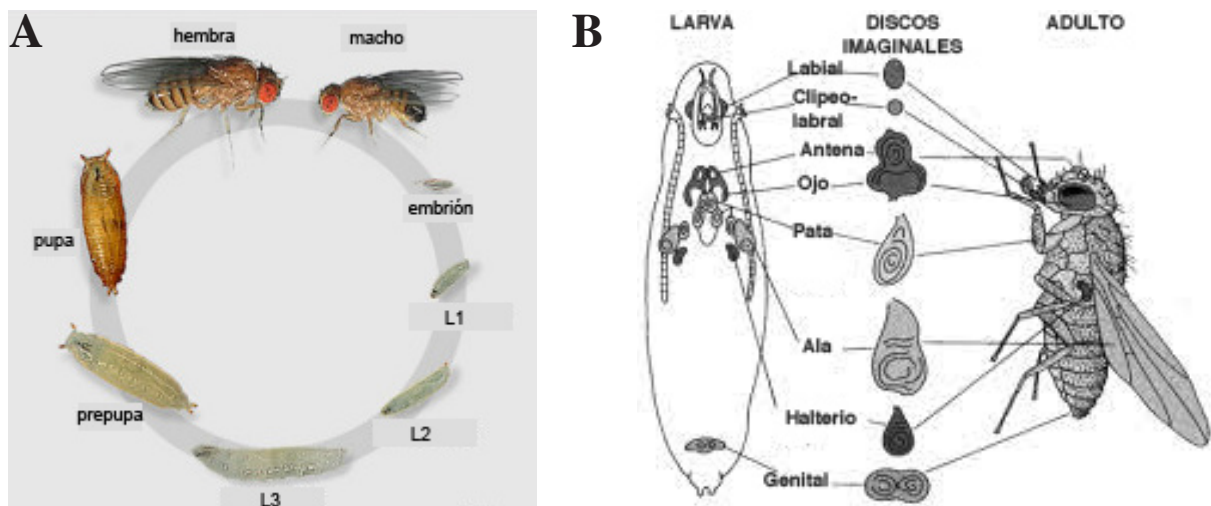


Figura I2. Desarrollo de *Drosophila*. (A) Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*. (B) Representación esquemática de los discos imaginales en la larva y las estructuras a las que dan lugar en el individuo adulto.

3. El desarrollo del disco imaginal de ala en *Drosophila*

El disco imaginal de ala es el primordio del ala y el mesotórax dorsal del adulto. Se especifica durante la embriogénesis en un grupo de células entre los parasegmentos 4 y 5 por la acción de los gradientes de los morfógenos Wingless (Wg) y Decapentaplegic (Dpp) (Morata, 2001).

En general, los discos imaginales son estructuras compuestas de dos capas epiteliales, el disco propio y la membrana peripodial. El disco propio está formado por un epitelio columnar pseudoestratificado. La membrana peripodial es un epitelio escamoso que se requiere para la eversión de los discos durante la metamorfosis (Antonio García-Bellido, 2009; Pastor-Pareja et al., 2004). El epitelio monocapa que compone los discos es un modelo biológico idóneo para el análisis de la proliferación y los cambios en la especificidad celular por su simplicidad estructural.

El disco imaginal de ala está subdividido en unidades de linaje llamadas compartimentos (García-Bellido et al., 1973; Morata & Lawrence, 1977) (Fig. I3 A). La primera subdivisión ocurre durante la embriogénesis y separa los compartimentos anterior (A) y posterior (P) gracias a la expresión del gen *engrailed* (*en*) (Morata & Lawrence, 1975). Durante el segundo estadio larvario, la expresión del gen *apterous* en las células del compartimento dorsal ocasiona que el disco se subdivida en dos nuevos compartimentos, dorsal (D) y ventral (V) (A. García-Bellido, 1975; García-Bellido et al., 1973; M. Zecca et al., 1995; Myriam Zecca & Struhl, 2002). Es importante destacar que los bordes de compartimento no sólo separan células con diferente especificidad, sino que también son centros organizadores del desarrollo (Díaz-Benjumea & Cohen, 1993; Tabata et al., 1995). Los bordes A/P y D/V expresan los morfógenos Dpp y Wg respectivamente, y ambos regulan el crecimiento y patrón del ala en desarrollo (Barrio & Milán, 2020; De Celis, 2003). Mutaciones en estos genes dan lugar a defectos en el tamaño y patrón del ala (Barrio & Milán, 2020; de Celis et al., 1996). El gradiente de los morfógenos Wg y Dpp define la localización espacial de los elementos de patrón característicos del ala adulta. Sin embargo, este gradiente no es necesario para su función como promotores del crecimiento, ya que la capacidad de Wg y Dpp para dirigir el crecimiento no se ve alterada cuando se sobreexpresan en todas las células del disco de ala formas ancladas a membrana incapaces de difundir (Baena-Lopez et al., 2009; P. S. Bosch et al., 2017).

El patrón característico del ala adulta de *Drosophila* se compone de cinco venas longitudinales y dos venas transversales distribuidas en posiciones invariantes a lo largo del eje A/P, separadas por zonas de intervena (Fig. I3 B) (Blair, 2007; De Celis, 2003). El desarrollo de las venas del ala se puede dividir en dos estadios temporales diferentes: (1) el estadio inicial que comienza

a mitad del tercer estadio larvario y en el cual se produce la especificación genética de venas e intervenas, y (2) la diferenciación celular que ocurre durante los estadios pupales. Durante el desarrollo larvario, las rutas de Dpp y Hedgehog (Hh) son los principales reguladores de la expresión de los genes específicos de vena e intervena a lo largo del eje A/P. Las células del compartimento posterior secretan el morfógeno Hh que activa a Dpp en las células anteriores cercanas al borde de compartimento. Desde ahí, Dpp difunde por todo el disco y controla el posicionamiento de las venas L2 y L5 mediante la regulación de la expresión de los genes *spalt*, *knirps* y el complejo *iroquois* (de Celis & Barrio, 2000; Gomez-Skarmeta et al., 1996). A la vez, *blistered* se expresa en las intervenas (Fristrom et al., 1994). Por otro lado, Hh especifica las venas L3, L4 y el espacio entre ellas, independientemente de su función como activador de la expresión de Dpp, mediante la activación del factor de transcripción Knot en la intervena L3/L4 y el complejo *iroquois* en la provena L3 (Croizatier et al., 2002; Gomez-Skarmeta et al., 1996).

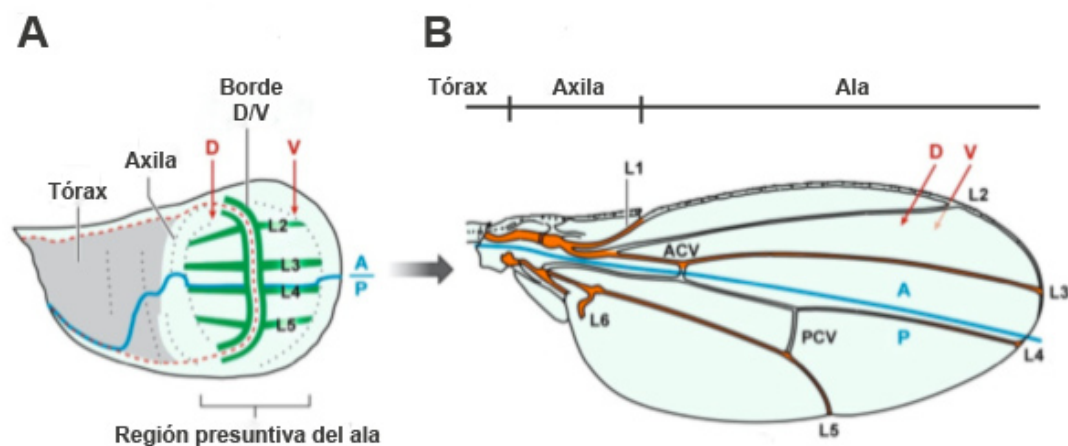


Figura I3. Esquema del disco imaginal de ala (A) y del ala adulta (B). Se indican las venas longitudinales (L1-L5), las venas transversales (ACV y PCV), los compartimentos anterior (A) y posterior (P) separados por una línea azul, y los compartimentos dorsal (D) y ventral (V) separados por una línea roja discontinua. Modificado de (Blair, 2007).

4. Los discos imaginales como modelo en estudios de regeneración

El descubrimiento de la capacidad de regenerar de los discos imaginales fue realizado por Ernst Hadorn y sus colaboradores a partir de la segunda mitad de la década de 1940 gracias a diferentes experimentos en los que se analizó el proceso regenerativo en *Drosophila*. Estos estudios pioneros consistían en extraer los discos imaginales de la larva, cortarlos, y posteriormente implantar los fragmentos en el abdomen de una hembra adulta donde las células proliferan pero no diferencian (Hadorn & Buck, 1962). Un análisis sistemático de este fenómeno les

permitió concluir que al fragmentar un disco en dos partes, el fragmento mayor regenera la parte eliminada, mientras que el menor se duplica especularmente (Bryant, 1971). Además, para inducir la diferenciación de las células de los discos y conocer el grado de determinación de las partes del disco que habían sido eliminadas, se introducían fragmentos de discos dentro de larvas de tercer estadio, esto permitía que durante la metamorfosis el fragmento implantado pudiera diferenciar, por lo que se podía observar qué estructuras originaban (Worley et al., 2012). Esto permitió establecer mapas de destino celular muy detallados, y concluir que existía un alto grado de determinación en los discos de tercer estadio larvario (G. Schubiger, 1971). Posteriormente, se han empleado numerosas aproximaciones para inducir daño en los discos imaginales de *Drosophila*, como por ejemplo la irradiación con rayos X (Fukunaga & Kondo, 1985; Haynie & Bryant, 1977), la recombinación mitótica para generar clones de células homocigóticas para una mutación letal sensible a la temperatura (Addison et al., 1995; Brook et al., 1993), el corte y cultivo *in vitro* o el corte *in situ*. Estas técnicas han contribuido considerablemente al conocimiento de los mecanismos que controlan la respuesta al daño en los discos imaginales. Recientemente, el desarrollo de sistemas de ablación genética ha permitido controlar la inducción del daño de manera específica en un dominio concreto durante un tiempo determinado, sin variar las condiciones fisiológicas (Bergantiños et al., 2010; Fox & Spradling, 2009; Jiang et al., 2009; Smith-Bolton et al., 2009). El método de ablación genética se basa en la expresión transitoria de un gen pro-apoptótico en determinados dominios del disco mediante la utilización de los sistemas binarios Gal4/UAS (Brand & Perrimon, 1993), LexA LHG/Lexop (Lai & Lee, 2006; Santabárbara-Ruiz et al., 2015) o QF/QUAS en combinación con Gal80^{ts} o QS (Potter et al., 2010) (ver Materiales y métodos). Estos métodos de ablación han permitido llevar a cabo experimentos de regeneración a gran escala, como ATACseq o RNAseq, y screenings o búsquedas genéticas para identificar genes implicados en la regeneración (Brock et al., 2017; Khan et al., 2017; Vizcaya-Molina et al., 2018; Worley et al., 2018).

4.1. Procesos regenerativos en los discos imaginales

Durante la regeneración de los discos se pueden distinguir diferentes etapas: el cierre de la herida, la proliferación celular, la re-especificación celular y finalmente la formación del patrón.

Proliferación regenerativa

Diversos experimentos han mostrado que durante la regeneración de los discos imaginales de *Drosophila* se activa la proliferación celular. Así, se ha observado la presencia de células en mitosis y síntesis de ADN en la región próxima a la herida antes de que se complete el cierre

de la misma (Adler & MacQueen, 1984; Karpen & Schubiger, 1981; O'Brochta & Bryant, 1987). Esta zona de alta tasa de proliferación celular es similar al blastema o conjunto de células mesenquimales proliferativas que se acumulan en la zona próxima a la herida tras amputaciones en varios modelos de vertebrados (M. Bosch et al., 2008).

Experimentos de irradiación con rayos X que eliminaban hasta el 40-60 % de las células de los discos mostraron que se podían recuperar estructuras adultas de tamaño y función normales (Haynie & Bryant, 1977). Estos experimentos demostraron que se producía un incremento del número de células en división de forma difusa por todo el disco, fenómeno al que se denominó proliferación compensatoria. Esta proliferación se caracteriza tanto por un incremento del ritmo de división como por una dilatación del período proliferativo (Wells & Johnston, 2012). Aunque la proliferación celular en blastemas es localizada, y en los fenómenos de proliferación compensatoria es difusa, se asume que las bases moleculares pueden ser similares (Worley et al., 2012).

Re-especificación celular

La formación de un tejido que se ha perdido depende no sólo de la activación de la división celular, sino además de una correcta especificación y diferenciación celular.

Durante la regeneración de los discos, se ha descrito que ocurren cambios de especificidad celular. Uno de las primeras descripciones fue a cargo de Ernst Hadorn y sus colaboradores en 1965. Estos investigadores estaban interesados en conocer el grado de estabilidad de la determinación celular. Para ello, realizaban cortes en discos, los implantaban en larvas, y una vez regenerados, volvían a diseccionarlos y reimplantarlos, repetían este proceso sucesivamente durante muchas generaciones. De esta manera, demostraron que las células imaginales larvarias que estaban determinadas hacia un destino celular concreto podían cambiar de especificidad, a este fenómeno lo denominaron transdeterminación (Hadorn, 1968). Desde el trabajo pionero de Hadorn et. al., muchos otros cambios de especificidad celular han sido descritos en el contexto de la regeneración usando discos imaginales larvarios, principalmente el disco de ala. Por ejemplo, se ha encontrado que durante la regeneración del disco imaginal de ala los destinos celulares de vena e intervena se re-especifican para intercalar los elementos de patrón perdidos (Repiso et al., 2013). De manera similar, las células del disco de ala que formarán la axila en el adulto son capaces de generar células presuntivas del ala (Herrera et al., 2013; Smith-Bolton et al., 2009; Verghese & Su, 2016), y las células cercanas al borde de compartimento pueden cambiar su especificidad adquiriendo la del otro compartimento tras la inducción de un daño (Herrera & Morata, 2014).

Introducción

Se han descrito algunos mecanismos implicados en la adquisición de nuevas especificidades durante la regeneración. Por ejemplo, estudios recientes han revelado que el incremento en la actividad de la ruta JNK que se observa tras un daño reduce la represión mediada por el grupo Polycomb (Lee et al., 2005), complejo génico que promueve el silenciamiento de la expresión génica.

La reducción de la represión mediada por el grupo Polycomb tras la inducción de un daño incrementa la frecuencia de los eventos de transdeterminación (Lee et al., 2005) así como otros tipos de cambios de especificidad celular (Eun et al., 2017). Además, se han encontrado algunos genes implicados en la estabilización de la especificidad celular durante la regeneración. Por ejemplo, el regulador de la cromatina Taranis estabiliza la especificidad celular de las células de los compartimentos durante la regeneración (Schuster & Smith-Bolton, 2015), y el co-represor transcripcional CtBP estabiliza la especificidad de las células tras un daño inhibiendo los efectos desestabilizadores de las rutas JNK y Jak/STAT, las cuales promueven plasticidad celular (Worley et al., 2018). A pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos que controlan los procesos de re-especificación celular durante la regeneración éstos aún no se conocen en su totalidad.

4.2. Respuesta sistémica durante la regeneración de los discos imaginales

Varios estudios han mostrado que se produce un retraso en la pupación tras la irradiación de larvas (Hussey et al., 1927) o la inducción de un daño en discos imaginales (Simpson et al., 1980). Este proceso de elongación del estadio larvario se denomina “checkpoint” regenerativo y facilita la regeneración de los discos permitiendo que tengan más tiempo para proliferar. La regulación de este proceso está mediado por la proteína de la familia de la insulina/relaxina, Dilp8. La expresión de Dilp8 es activada por la ruta JNK (Colombani et al., 2012; Katsuyama et al., 2015), Yorkie (Yki) (Boone et al., 2016), e indirectamente por la enzima modificadora de la cromatina Trithorax (Skinner et al., 2015). Cuando los discos son dañados Dilp8 inhibe la síntesis de la hormona Ecdisona indirectamente a través de Lgr3 (Colombani et al., 2015) y NOS (Jaszczak et al., 2015, 2016).

4.3. Pérdida de la capacidad regenerativa en los discos imaginales

Al igual que ocurre con otras especies, la capacidad regenerativa de *Drosophila* se pierde durante el desarrollo. De manera que, aunque los discos pueden regenerar, las estructuras del

adulto que originan han perdido esa capacidad. Se ha propuesto que esta capacidad se pierde al final del tercer estadio larvario. Numerosos estudios han descrito que en respuesta a un daño en los discos imaginales durante el inicio del tercer estadio larvario se activan una serie de señales que conducen al crecimiento regenerativo, como JNK, JAK/STAT y Wg. Sin embargo, cuando el daño se induce en discos de ala durante el final del tercer estadio larvario, la activación de JAK/STAT y Wg disminuye fuertemente, dando lugar a la ausencia de alas en el adulto (Bergantiños et al., 2010; Katsuyama et al., 2015; Santabàrbara-Ruiz et al., 2015; Smith-Bolton et al., 2009).

Se han descrito varios mecanismos implicados en la pérdida de la capacidad regenerativa en los discos de *Drosophila*. Por un lado, estudios recientes han identificado regiones reguladoras (enhancers) de respuesta al daño (Kang et al., 2016). Estas regiones contienen una región activadora que induce la expresión génica tras un daño, y una región represora que media el silenciamiento del enhancer a través de cambios en la cromatina cuando aumentan los niveles de Ecdisona antes de la pupación. Un ejemplo de este tipo de enhancers de respuesta al daño es el enhancer BRV118 del gen *wnt* de *Drosophila* (Harris et al., 2016). Además, experimentos de ATACseq realizados en discos de ala sometidos a ablación genética a distintos tiempos, han mostrado que varias regiones de cromatina cerrada se abren tras la inducción del daño, lo cual sugiere que durante la regeneración se producen cambios en la actividad de distintos enhancers a lo largo del genoma que podrían ser requeridos durante el proceso regenerativo (Vizcaya-Molina et al., 2018). Estos enhancers que se activan específicamente en respuesta al daño, no sólo se han identificado en *Drosophila*, sino también en otros modelos animales como gusanos acelomorfos, el corazón del pez cebra y el ratón (Gehrke et al., 2019; Goldman et al., 2017).

Por otro lado, la pérdida de la capacidad regenerativa de los discos en *Drosophila* coincide con el aumento de los niveles de la hormona Ecdisona (Fig. I4). Como hemos mencionado anteriormente esta hormona se sintetiza en la glándula protorácica. La síntesis de la Ecdisona se produce una vez que la larva ha alcanzado el peso crítico entre las 8 y 12 h después de la transición del segundo al tercer estadio larvario (McBrayer et al., 2007; C. Mirth et al., 2005; Nijhout et al., 2014). Se ha observado que la alimentación de larvas tempranas con Ecdisona limita la capacidad regenerativa de forma prematura (Halme et al., 2010; Jaszczak et al., 2016), mientras que la inhibición de la síntesis de Ecdisona prolonga la capacidad de los discos para regenerar en respuesta al daño (Katsuyama & Paro, 2013). Un estudio reciente ha demostrado que la pérdida de la capacidad regenerativa del disco de ala durante el tercer estadio larvario se debe en parte a la síntesis de Ecdisona. Esta hormona activa la expresión del factor de transcripción Broad, que inhibe la regeneración mediante la represión de la expresión del gen *chinmo*. La disminución de la señalización de la Ecdisona (EcR^{DN} o EcR^{RNAi}) o de Broad en

discos de ala al final del tercer estadio larvario aumenta la expresión de *chinmo* en respuesta al daño y rescata la capacidad regenerativa (Narbonne-Reveau & Maurange, 2019).

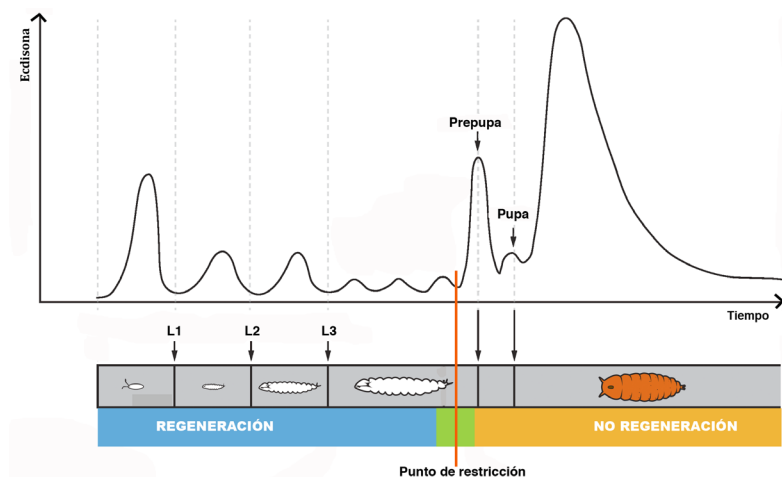


Figura I4. Pérdida de la capacidad regenerativa en los discos imaginales de *Drosophila melanogaster*. Los discos son capaces de regenerar durante el desarrollo larvario (azul), pero pierden esta habilidad al final del tercer estadio larvario (verde), momento que se conoce como punto de restricción. El aumento de la hormona Ecdisona al final del tercer estadio larvario da lugar al comienzo de la metamorfosis (naranja), y coincide con el final de la capacidad regenerativa de los discos. Modificado de Mirth lab.

El hecho de que los discos imaginales regeneren únicamente durante una etapa de su ciclo vital y después pierdan esta habilidad, los convierte en sistemas idóneos para el estudio de los mecanismos que impiden la regeneración a medida que los organismos se desarrollan.

5. Regulación del ciclo celular en el disco de ala

Durante el desarrollo larvario, las células del disco imaginal de ala se dividen siguiendo un ciclo convencional de cuatro fases, G1-S-G2-M, hasta alcanzar un número de aproximadamente 50 000 células. Al final del tercer estadio larvario las células se paran en fase G2. Y finalmente, tras la metamorfosis, la mayoría de las células se dividen dos veces más antes de salir del ciclo en la fase G1.

5.1. Proliferación celular en el disco imaginal de ala durante el desarrollo larvario

La transición G1-S está regulada por la expresión de CycE, cuyo pico de activación transcripcional tiene lugar antes de cada fase S. Simultáneamente, se activa el factor de transcripción E2F. E2F es un heterodímero formado por las subunidades E2F y DP que controla la expresión de genes necesarios para la replicación del ADN y la mitosis, incluyendo varias Ciclinas y quinasas dependientes de Ciclina (Cdks), como por ejemplo CycE, String y PCNA (Dimova et al., 2003).

La unión de las proteínas del Retinoblastoma (RBs) con los complejos E2F-DP los convierte en represores mediante el reclutamiento de complejos modificadores de la cromatina, mientras que los complejos CycE-Cdk2 fosforilan RB impidiendo su unión a los complejos E2F-DP y promoviendo de esta manera la transcripción mediada por E2F (Du & Pogoriler, 2006). Por lo tanto, existe un sistema de retroalimentación positiva entre CycE y E2F, y la activación de uno sólo de estos reguladores es suficiente para promover la entrada en el ciclo celular (Fig. I5). Junto con RB, Dacapo que es el ortólogo del inhibidor de las Cdks p21, regula negativamente la actividad de CycE, y su función es necesaria para la salida de la fase G1 (de Nooij et al., 1996; Du & Dyson, 1999; Firth & Baker, 2005; Lane et al., 1996). La salida de la fase S depende de la degradación de CycE por el complejo SCF ubiquitin ligasa. Posteriormente, Cdk1 junto con CycA y CycB controla la entrada en mitosis en la transición G2-M y la progresión a través de la fase M. Dos enzimas con actividades opuestas controlan la actividad de Cdk1 mediante su estado de fosforilación. Mientras que la quinasa Wee1 regula negativamente Cdk1 mediante fosforilación, las fosfatasas String y Twine eliminan el grupo fosfato que inhibe la función de esta quinasa, de manera que cuando es desfosforilado se promueve la entrada en mitosis (Dunphy & Kumagai, 1991; Edgar & Datar, 1996).

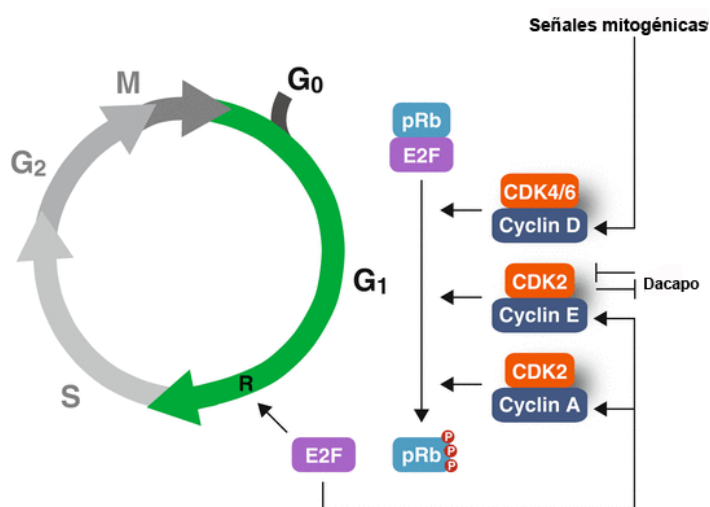


Figura I5. Retroalimentación positiva entre CycE y E2F. Las señales mitogénicas aumentan la transcripción y estabilidad de la CycD que junto con CDK4/6 fosforila a la proteína Rb. La hiperfosforilación de Rb libera al factor de transcripción E2F que activa la expresión de CycE y CycA, entre otros reguladores del ciclo. Los complejos CycE/CDK2 y CycA/CDK2 aumentan aún más la fosforilación de Rb. Es decir, existe una retroalimentación positiva entre CycE y E2F, de manera que la activación de CycE o E2F es suficiente para inducir la transición G1/S. Dacapo inhibe a CycE/CDK2 y CycE/CDK2 activa la degradación de Dacapo a través de SCF. Modificado de (Poon, 2016).

5.2. Proliferación celular en el disco imaginal de ala durante el desarrollo pupal

Las células del disco imaginal de ala continúan proliferando durante el desarrollo de pupa hasta las 24 h después de la formación del pupario (DFP). Experimentos de citometría de flujo (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) han permitido definir en qué fase del ciclo celular

se encuentran las células de los discos de las ala durante el desarrollo pupal (O'Keefe et al., 2012) (Fig. I6). Este tipo de análisis ha mostrado que en los discos de ala existen unos niveles elevados de células en las fases G1, G2 y S del ciclo celular 2 h DFP. A las 6 h DFP, las células paran temporalmente de dividirse y permanecen paradas en la fase G2 del ciclo celular. Esta parada da lugar a una sincronización de la última ronda de división celular. A las 18 h DFP, la mayoría de las células del disco de ala re-entran en el ciclo celular y completan la última ronda de división (Milán et al., 1996; O'Keefe et al., 2012; M. Schubiger & Palka, 1987). A las 24 h DFP, alrededor del 95% de las células del disco de ala están paradas en la fase G1, y se observan muy pocas células en las fases S o M. Únicamente algunas células neuronales del margen anterior del disco de ala continúan proliferando. Finalmente, entre las 24 h y las 36 h DFP no se observa ninguna célula en división en la región presuntiva del ala del disco imaginal.

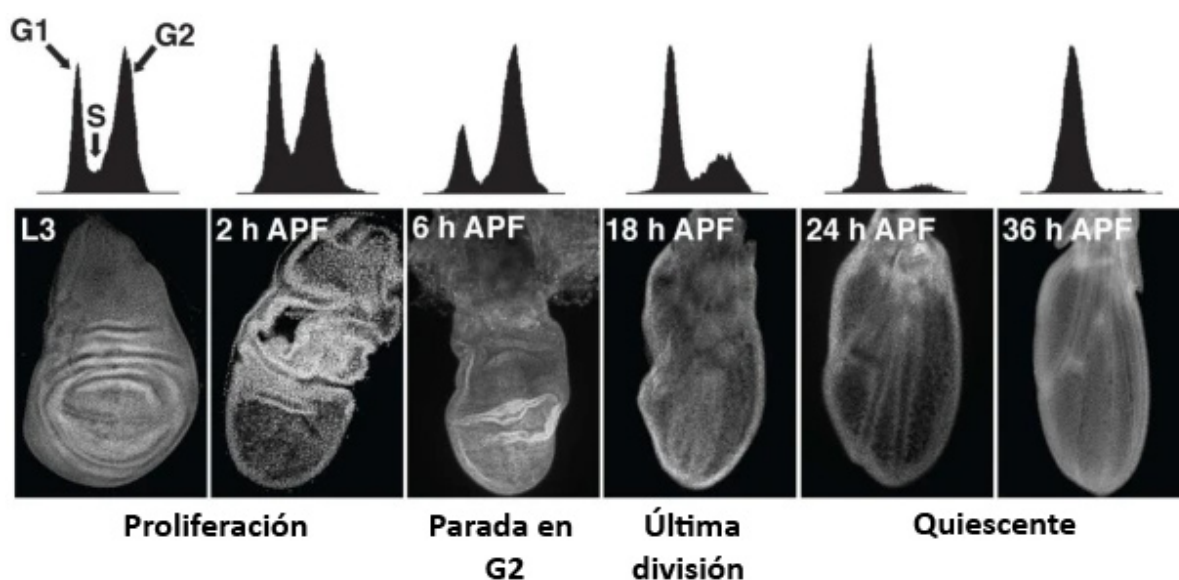


Figura I6. Patrón del ciclo celular en el disco imaginal de ala durante el final del desarrollo larvario y la pupa. Diagrama temporal de experimentos de FACS e imágenes de tinciones con DAPI (marcaje de núcleos) en discos de ala a distintas edades. Las células del disco imaginal de ala abandonan el ciclo celular en la fase G1 a las 24 h APF. APF: después de la formación del pupario. Modificado de (O'Keefe et al., 2012).

5.2.1. Función de los genes reguladores del ciclo celular en el disco de ala durante el desarrollo pupal

Al igual que ocurre durante el desarrollo larvario, durante las dos últimas rondas de división celular que ocurren entre las 0 h y las 24 h DFP existe el sistema de retroalimentación positiva entre CycE y E2F que hemos descrito anteriormente. De manera, que se ha mostrado que la activación ectópica de CycE, CycD o E2F a partir de las 0 h DFP induce proliferación y es

suficiente para prolongar el periodo proliferativo del disco de ala pupal hasta las 30 h DFP. Sin embargo, la sobre-expresión de estos reguladores no es suficiente para promover proliferación celular a partir de las 28 h DFP. Para inducir división celular a partir de las 28 h DFP es necesaria la activación ectópica de ambos reguladores del ciclo a la vez, CycE y E2F o CycD y E2F (Buttitta et al., 2007, 2010). Por lo tanto, el sistema de retroalimentación positiva entre CycE/Cdk2 y E2F existente durante el desarrollo larvario y el comienzo del desarrollo pupal deja de funcionar a las 24 h DFP, momento en el que la mayoría de las células del disco de ala abandonan el ciclo celular.

5.2.2. Regulación epigenética de los genes que controlan la proliferación celular durante el desarrollo pupal

Como hemos descrito la salida de las células del disco de ala del ciclo celular se produce a las 24 h DFP de manera sincronizada. Las células tras este momento permanecen en un estado de quiescencia, ya que esta fase es reversible, y la activación de genes reguladores del ciclo es suficiente para inducir proliferación celular. Más tarde, a partir de las 30 h DFP, la salida del ciclo celular es permanente o robusta, en esta fase las células postmitóticas y diferenciadas del disco de ala se vuelven resistentes a las señales proliferativas y la re-entrada en el ciclo celular.

Estudios de ATCseq han mostrado que durante el desarrollo pupal se producen cambios en la estructura de la cromatina que podrían alterar la actividad de las regiones reguladoras de algunos genes que codifican para reguladores clave del ciclo celular, como *e2f1*, *cycE* o *string*. La accesibilidad de la cromatina asociada a las regiones reguladoras de estos genes es baja durante la parada de las células en G2, aumenta a las 18 h y 24 h DFP, y se cierra después de las 36 h DFP. La dinámica de la expresión de reporteros GFP de los genes *e2f1*, *cycE* o *string* se correlaciona con los cambios en la accesibilidad de la cromatina asociada a enhancers específicos de estos genes (Ma et al., 2019).

Por lo tanto, se ha propuesto que la causa de la salida permanente del ciclo celular de las células del ala pupal se debe a que cambios en la estructura de la cromatina en las regiones reguladoras de genes como *e2f1*, *cycE* o *string*, bloquean su expresión de forma permanente. Además, este cambio en la estructura de la cromatina en ciertas regiones reguladoras de genes clave del ciclo celular, como *e2f1*, *cycE* o *string*, es independiente de si se produce o no la salida de las células del ciclo celular. Así, se ha descrito que la inhibición de la salida del ciclo celular mediante la sobre-expresión de E2F y CycD/Cdk4 no impide que se produzca el cierre de la cromatina en

estos enhancers.

5.2.3. Función de la hormona Ecdisona en el control de la proliferación celular durante el desarrollo pupal

La hormona esteroidea Ecdisona no sólo cumple una función esencial coordinando la transición entre los diferentes estadios del desarrollo sino que también regula la salida del ciclo celular en las células del disco de ala durante el desarrollo pupal. Durante la metamorfosis se producen dos picos de activación de la hormona Ecdisona, uno en la transición larva-pupa y otro alrededor de las 24 h DFP (Ashburner, 1989) (Fig. I6).

El primer pico de activación de la Ecdisona induce la expresión del factor de transcripción Broad, que a su vez se une a secuencias reguladoras del gen *string* e inhibe su expresión, dando lugar a una parada temporal de las células en la fase G2. A medida que los niveles de Ecdisona disminuyen, los niveles de Broad también bajan, permitiendo la re-activación de *string*, lo que promueve la última ronda de división celular en el disco de ala, que finaliza de forma sincrónica a las 24 h DFP (Guo et al., 2016).

El segundo pico de Ecdisona activa a un conjunto de factores de transcripción implicados en la diferenciación de las células del disco de ala y coincide temporalmente con los cambios en la accesibilidad de la cromatina asociada a ciertas regiones reguladoras de los genes *cycE*, *e2f1* y *string*, que hemos descrito anteriormente. Un estudio reciente ha mostrado que la Ecdisona activa diferentes factores de transcripción en diferentes ventanas temporales durante el desarrollo del disco de ala (Uyehara et al., 2017). Curiosamente, uno de estos factores de transcripción de respuesta a la Ecdisona denominado E93 tiene un papel fundamental en el control de la accesibilidad de la cromatina a lo largo del genoma, promoviendo o impidiendo la transcripción de diferentes genes y regulando así las últimas transiciones durante el desarrollo del disco de ala pupal. El pico de expresión del factor de transcripción E93 se produce a las 24 h DFP, de manera que es posible que el cierre de la cromatina en las regiones reguladoras de los genes *cycE*, *e2f1* y *string* que se produce en el disco de ala pupal sea inducido por E93 o por complejos remodeladores de la cromatina reclutados por E93. De esta manera, la Ecdisona no sólo tendría una función induciendo la salida de las células del disco de ala del ciclo celular, sino que también controlaría el cierre epigenético de regiones reguladoras de genes clave en el control del ciclo celular en el disco de ala pupal.

Se han logrado importantes progresos en el conocimiento de los mecanismos moleculares

que controlan el inicio y mantenimiento del silenciamiento de la expresión de los genes que codifican para reguladores clave del ciclo celular. Sin embargo, aún no se conoce por qué ciertas células postmitóticas son refractarias a las señales proliferativas, mientras que otras mantienen la capacidad de re-entrar en el ciclo celular en respuesta a estas señales mitogénicas. Además se desconoce cómo responden las células en diferentes momentos del desarrollo pupal a las señales mitogénicas inducidas cuando se produce un daño. La salida sincronizada del ciclo celular que se produce durante la metamorfosis hace que el disco imaginal de ala de pupa sea un buen modelo para abordar esta cuestión.

6. El disco imaginal de ala como modelo en estudios de proliferación inducida por apoptosis

Existe un control estricto del número de células en cada tejido a lo largo del desarrollo y la vida adulta de los organismos multicelulares. Sin embargo, diversas alteraciones pueden desencadenar la eliminación de células mediante apoptosis o muerte celular programada. Por ello, los procesos de proliferación celular y muerte celular deben estar muy bien coordinados y estrechamente controlados para mantener la homeostasis de los tejidos y supervivencia del organismo. La pérdida de células mediante apoptosis tras un evento de estrés induce la activación de la división celular en las células vecinas, un proceso que se conoce como proliferación inducida por apoptosis (AiP). Por ejemplo, tras amputaciones en *Hydra*, se ha encontrado que las células apoptóticas inducen la proliferación de las células del blastema mediante señalización de Wnt3 (Chera et al., 2009). Ejemplos similares se han observado en mamíferos y otros invertebrados, siendo *Drosophila* uno de los organismos modelo que más ha contribuido en el estudio de los mecanismos genéticos y moleculares que regulan la AiP.

La apoptosis es un tipo de muerte celular controlada genéticamente y conservada entre los metazoos. En *Drosophila*, tras la señal apoptótica, se activa la expresión de los genes pro-apoptóticos *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*) y *grim* que codifican para unas proteínas encargadas de ubiquitinar y mandar a degradación a la proteína inhibidora de la apoptosis 1 de *Drosophila* (Diap1), liberando a la caspasa iniciadora Dronc de la inhibición por Diap1. La caspasa Dronc, junto con Ark, activa a las caspasas efectoras DrICE y Dcp1 mediante un corte proteolítico, activándose así la muerte celular.

En *Drosophila*, existen tres modelos de AiP en función de la metodología utilizada (Diwanji & Bergmann, 2019). En el modelo de las células “no-muertas” se emplea la proteína P35 para bloquear a las caspasas efectoras, de esta manera la apoptosis puede iniciarse pero se impide

su ejecución. En los modelos de AiP “genuino” y “postmitótico” no se hace uso de la proteína P35 permitiendo que las células completen el programa apoptótico. Para evitar la letalidad del organismo, la apoptosis se induce en un espacio y durante un tiempo restringidos, o en un tejido que no comprometa la supervivencia, como puede ser la retina en desarrollo. Estos estudios han permitido elucidar los mecanismos básicos que controlan la AiP. Se ha demostrado que las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas por las células apoptóticas activan las rutas JNK y p38 (Fogarty et al., 2016; Santabárbara-Ruiz et al., 2015). JNK y p38 activan la expresión de la ruta JAK/STAT, la cual también está implicada en la activación de la proliferación celular (Katsuyama et al., 2015; La Fortezza et al., 2016; Pastor-Pareja et al., 2008; Santabárbara-Ruiz et al., 2015; Verghese & Su, 2016). Sin embargo, la contribución de JAK/STAT es controvertida ya que recientemente se ha propuesto su función restringiendo el daño causado por la activación de la ruta JNK, facilitando así el inicio de la AiP (La Fortezza et al., 2016). Además, la caspasa iniciadora Dronc, independientemente de su papel en la apoptosis, activa la ruta JNK que promueve la secreción de mitógenos como Wg, Dpp y Spitz para estimular la división celular (Huh, Guo, et al., 2004; Kondo et al., 2006; Pérez-Garijo et al., 2004; Wells et al., 2006). Dronc también induce la generación de ROS a través de la oxidasa NADPH dDuox en la membrana plasmática (Khan et al., 2017). Se ha observado que, junto con JNK, p53 también es importante para activar la AiP, y ambos controlan la expresión de los genes pro-apoptóticos *rpr* y *hid* (Shlevkov & Morata, 2012; Simón et al., 2014; Wells et al., 2006). Otros estudios mostraron que, en respuesta a los cambios en la tensión celular, la proteína Ajuba LIM inhibe la ruta Hippo dando lugar a la activación del factor de transcripción Yki, que se acumula en el núcleo y activa la transcripción de genes necesarios para la división celular, como por ejemplo *cycE* (Grusche et al., 2011; Meserve & Duronio, 2015; Repiso et al., 2013; G. Sun & Irvine, 2011).

Todos estos experimentos se han realizado en discos imaginales en estadios larvarios y han permitido conocer las bases moleculares que regulan la AiP. Sin embargo, si la AiP opera tras la metamorfosis o por qué deja de hacerlo a medida que avanza el desarrollo, durante los estadios de pupa, son preguntas que aún están sin resolver.



OBJETIVOS

Los objetivos centrales de esta tesis han sido estudiar los mecanismos que controlan el incremento de plasticidad en procesos regenerativos, y los mecanismos que limitan la capacidad de inducir proliferación en respuesta al daño a lo largo del desarrollo. Hemos abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar los mecanismos implicados en la inducción de la pérdida de marcadores de identidad celular en respuesta al daño.
2. Determinar hasta qué momento del desarrollo las células mantienen la capacidad de dividirse en respuesta a un daño.
3. Analizar las posibles causas de la pérdida de la respuesta proliferativa tras la inducción de un daño durante el desarrollo.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo y mantenimiento de *Drosophila melanogaster*

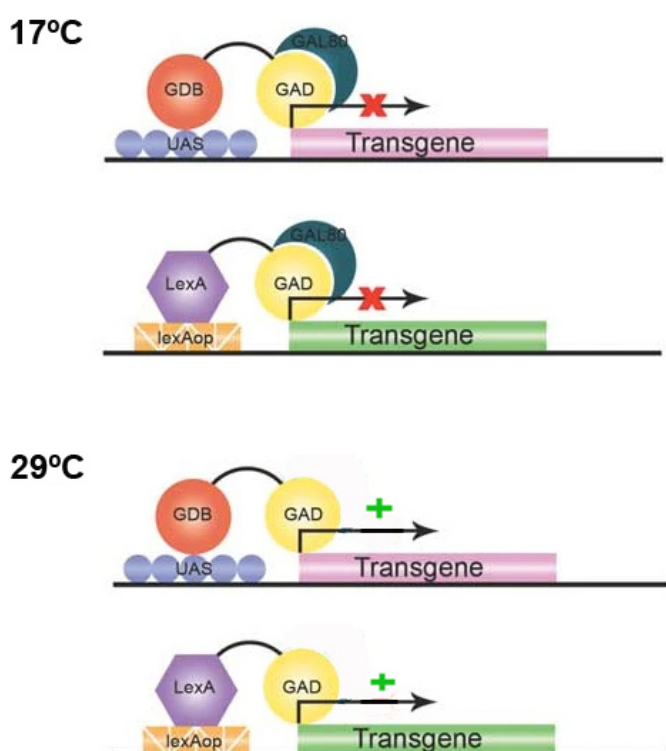
El mantenimiento de las estirpes y cruces de *Drosophila* se realizó en un medio de cultivo estándar en cámaras de temperatura (17°C, 25°C o 29°C según el experimento) y humedad reguladas.

2. Estirpes de *Drosophila melanogaster*

Todos los stocks utilizados están disponibles en Bloomington *Drosophila* Stock Center a no ser que se especifique lo contrario.

2.1. Sistemas binarios de expresión

Los sistemas binarios de expresión son un conjunto de herramientas genéticas procedentes de diferentes organismos, como levaduras y hongos, que permiten dirigir la expresión de genes de interés en un dominio espacial determinado y durante un tiempo acotado. Constan



de tres elementos: (1) un factor de transcripción que se induce bajo el control de una región reguladora determinada, (2) una secuencia activadora a la que se une el factor de transcripción para activar la expresión del gen efector de interés, y (3) un represor de la actividad transcripcional, cuya actividad puede controlarse por cambios de temperatura o presencia de moléculas como el ácido quínico. En este trabajo se han utilizado los sistemas Gal4/UAS/Gal80^{ts} y LHG/LexO/Gal80^{ts}.

Figura M1. Sistemas binarios de expresión Gal4/UAS/Gal80^{ts} y LHG/LexO/Gal80^{ts}. Modificado de (Lai & Lee, 2006).

En el sistema Gal4/UAS/Gal80^{ts} el factor de transcripción es Gal4 y se une a las secuencias UAS, mientras que en el sistema LHG/LexO/Gal80^{ts} el factor de transcripción es LHG y reconoce a las secuencias LexO. En ambos casos la proteína Gal80^{ts} actúa como un inhibidor del factor de transcripción. La actividad de Gal80^{ts} es sensible a la temperatura quedando inactivado a 29°C, y su expresión está controlada por el promotor ubicuo del gen *tubulina* (Fig. M1).

Se emplearon las siguientes líneas Gal4: *engrailed-Gal4* (*en-Gal4*), *hegedhog-Gal4* (*hh-Gal4*), *cubitus interruptus-Gal4* (*ci-Gal4*) y *apterous-Gal4* (*ap-Gal4*).

Las líneas UAS utilizadas fueron: *UAS-GFP*, *UAS-hep^{CA}* (II) (III), *UAS-hop^{tum-l}*, *UAS-hop^{ARNi}* (*TRIP-v20*), *UAS-microARNRHG* (cedido por Carlos Estella), *UAS-reaper*, *UAS-cycE*, *UAS-e2f1*, *UAS-dp*.

Se utilizaron las líneas *sal^{EP/V}-LHG* y *lexO-rpr*.

2.2. Líneas reporteras

Para detectar la expresión de diferentes genes, se utilizaron las siguientes líneas reporteras *10xSTAT92E-GFP*, *TRE-GFP*, *TRE-DsRed*, *puc-LacZ* y *bs^{P1292}* (*lacZ rosy+*).

2.3. Alelos de falta de función

Para el gen *dronc* se utilizó la combinación heteroalélica *droncⁱ²⁹/droncⁱ²⁴*. Los alelos *droncⁱ²⁹* y *droncⁱ²⁴* son mutaciones sin sentido o de terminación que dan lugar a letalidad en homocigosis.

3. Protocolo de sobre-expresión en larva

Para llevar a cabo los experimentos de sobre-expresión en larva, se mantuvieron los animales a 25°C hasta las 132+-12h después de la eclosión del huevo. En ese momento se cambiaron a 29°C durante 24 h para permitir la sobre-expresión de los genes de interés.

4. Protocolo de ablación genética en pupa

Hemos utilizado el sistema Gal4/UAS/Gal80^{ts} para dirigir la expresión del gen pro-apotótico *rpr* al compartimento posterior (*hh-Gal4*) del disco de ala.

Materiales y Métodos

En el caso de los experimentos en los que queríamos sobre-expresar simultáneamente *rpr* y *cycE* o *rpr* y *e2f1 dp* utilizamos el sistema LHG/LexO/Gal80^{ts} para dirigir la expresión de *rpr* al dominio central del ala (*sal^{EP/V}-LHG*), y el sistema Gal4/UAS/Gal80^{ts} para dirigir la expresión de los reguladores del ciclo *cyE* o *e2f1 dp* al compartimento anterior (*ci-Gal4*). Tanto el factor de transcripción LHG como Gal4 son inhibidos por el represor Gal80^{ts}, lo cual nos permite inducir ablación genética al mismo tiempo que sobre-expresamos *cycE* o *e2f1 dp*. El empleo de dos sistemas de expresión independientes permite la sobre-expresión de genes en patrones más complejos que los que permite un solo sistema. De esta manera la expresión de *rpr* y *cycE* o *rpr* y *e2f1 dp* solo se produce en la región de solapamiento de la línea *sal^{EP/V}-LHG* con la línea *ci-Gal4*, sirviendo el resto de regiones del disco como controles internos del experimento.

Los animales se mantuvieron a 17°C desde la puesta y posteriormente se recogieron prepupas de 0 h DFP para realizar los distintos experimentos (Fig. M2).

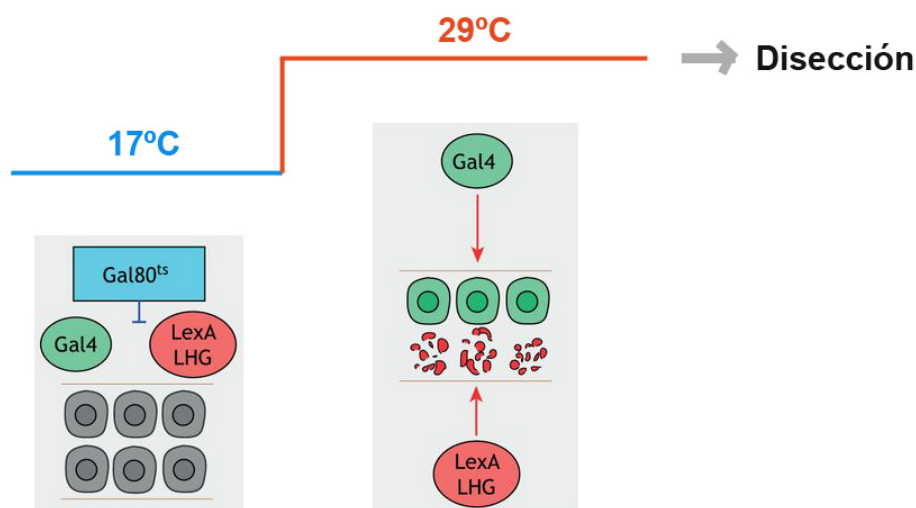


Figura M2. Representación de la sobre-expresión de dos genes en dominios diferentes gracias al empleo de los sistemas Gal4/UAS/Gal80^{ts} y LHG/LexO/Gal80^{ts}. Modificado de (Fox et al., 2020).

Cuando la inducción de muerte celular se produjo en estadios más tardíos, las pupas se mantuvieron a 17°C hasta el equivalente a 24 h DFP a 25°C. Después se cambiaron a 29°C hasta el equivalente a 30 h DFP y se diseccionaron los discos de ala. En los casos en los que se indujo ablación genética al mismo tiempo que se sobre-expresó *cycE* o *e2f1 dp* después de la salida del ciclo celular, las pupas se mantuvieron a 17°C hasta el equivalente a 26-30 h DFP. A continuación, se cambiaron a 29°C hasta el equivalente a 46-50 h DFP, momento en el que se diseccionaron los discos imaginales de ala.

El desarrollo tiene lugar 1.2 veces más rápido a 29°C que a 25°C, y 2.5 veces más despacio a 17°C que a 25°C en nuestras condiciones experimentales. Todos los tiempos de incubación han sido ajustados a sus equivalentes estadios a 25°C.

5. Irradiación con rayos X de pupas

Los animales se mantuvieron a 25°C desde la puesta, posteriormente se recogieron prepupas de 0 h DFP para realizar los distintos experimentos. Se irradiaron pupas silvestres de 0 h, 10 h y 20 h DFP con el equipo de rayos X Philips-MG-102 a 4000R (8 minutos y 16 segundos), y se diseccionaron 20 h más tarde para analizar el índice mitótico de los discos de ala a las 20 h, 30 h y 40 h DFP respectivamente.

En los casos de sobre-expresión de *cycE* o *e2F1 dp* e irradiación, se utilizó el sistema Gal4/UAS/Gal80^{ts} para dirigir la expresión *cycE* o *e2F1 dp* al compartimento posterior mediante la línea *en-Gal4*. Los animales se mantuvieron a 17°C desde la puesta hasta las 0 h DFP. En ese momento se recogieron las prepupas de 0 h DFP y se cambiaron a 29°C. Posteriormente, se irradiaron pupas silvestres de 0 h y 25 h DFP, y se diseccionaron 25 h más tarde para analizar el índice mitótico y la apoptosis de los discos de ala a las 25 h y 50 h DFP respectivamente.

6. Tinciones inmunohistoquímicas

Para realizar las tinciones inmunohistoquímicas de discos imaginales de larva, se diseccionaron larvas de tercer estadio en PBS, se fijaron en Paraformaldehído 4% (PFA) durante 30 minutos, y posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tritón X-100 0,3% (PBT) y 3 lavados de 10 minutos con PBT-BSA 1%. Después se incubaron en anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Tras retirar el anticuerpo primario y realizar varios lavados con PBT, se incubaron con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente se realizaron varios lavados con PBT y se montaron los discos imaginales sobre portaobjetos en medio Vectashield (Vector Laboratories)

En el caso de las tinciones de discos imaginales de pupa, se eliminó la cutícula completa o el opérculo de las pupas en PBS y se fijaron en PFA a 4°C durante 24 h. Posteriormente, se retiró la membrana transparente pupal del disco imaginal de ala y se procedió igual que en el caso de las tinciones de discos de larva.

Los anticuerpos primarios utilizados se especifican en la siguiente tabla.

ANTICUERPO	ESPECIE	DILUCIÓN	ORÍGEN
anti-Ara	Rata	1:200	Sonsoles Campuzano
anti-knirps	Cobaya	1:500	Jose Felix de Celis y Mar Ruiz
anti-PH3	Ratón	1:200	Cell Signaling Technology
anti-Dcp1	Conejo	1:200	Cell Signaling Technology
anti-Salm	Conejo	1:200	José Félix de Celis
anti-PMad	Rata	1:100	Ginés Morata
anti-βGal	Ratón	1:200	Promega
anti-Wg	Ratón	1:100	Hybridoma Bank (DSHB)

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos Alexa Fluor 488, 555 y 647 de Invitrogen/Life Technologies: anti-ratón555, anti-rata555, anti-conejo647, anti-cobaya647. En el caso de las tinciones de discos imaginales de pupa se utilizó Faloidina conjugada con TRITC (tetrametilrodamina) de Sigma a 1:200 para marcar microfilamentos de F-actina.

7. Análisis por microscopía y procesamiento de imágenes

Las imágenes de microscopía confocal se tomaron con los microscopios LSM510 (Zeiss) y Nikon A1R+. El procesamiento de imágenes se realizó con los programas Fiji, ImageJ 1.44 y Adobe Photoshop.

8. Cálculo del índice mitótico en discos imaginales

Las células en mitosis se detectan por la presencia de PH3. Para la cuantificación del número de células en mitosis utilizamos proyecciones de todos los planos focales de cada disco y el programa ImageJ. Se calculó el índice mitótico como el cociente entre el número de células en mitosis, marcadas con el anticuerpo anti-PH3, y el área de la región en estudio.

9. Análisis estadístico

El efecto de pérdida no autónoma del marcador Ara en la vena L3 se dividió en tres fenotipos o categorías para su comparación y posterior análisis estadístico: (1) ausencia de la expresión

de Ara, (2) expresión de Ara reducida, y (3) expresión de Ara normal. Las comparaciones se hicieron mediante una prueba Chi-cuadrado χ^2 de Pearson con un nivel de significación $p \leq 0.001$. Para ello se utilizó el programa Prism6.

Las comparaciones de los índices mitóticos de cada condición experimental se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

RESULTADOS

1. PÉRDIDA DE LA ESPECIFICACIÓN CELULAR TRAS INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN DISCOS IMAGINALES DE ALA LARVARIOS: PAPEL DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN JNK Y JAK/STAT

1.1. Análisis de la contribución de las rutas JNK y JAK/STAT a la pérdida de especificación celular en el disco imaginal de ala.

Diferentes estudios han mostrado que durante el proceso regenerativo de los discos se producen cambios de especificación celular (Díaz-García & Baonza, 2013; Herrera & Morata, 2014; Lee et al., 2005; Repiso et al., 2013; Schuster & Smith-Bolton, 2015; Worley et al., 2018). Por otro lado, se ha observado que las rutas de señalización de la JNK y JAK/STAT se activan en procesos regenerativos (M. Bosch et al., 2005, 2008; Katsuyama et al., 2015; La Fortezza et al., 2016; Pastor-Pareja et al., 2008; Smith-Bolton et al., 2009). En este trabajo nos planteamos profundizar si las rutas JNK y JAK/STAT podrían estar implicadas en los cambios de especificación celular que se observan durante la regeneración.

En primer lugar, analizamos si la ruta de la JNK es necesaria para el proceso de pérdida de especificación celular. Para ello, activamos ectópicamente esta ruta en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario durante 24 h mediante el uso del sistema Gal4/UAS/Gal80^{TS} y posteriormente examinamos los marcadores de especificación de provena L3 y L5, Araucan (Ara) (perteneciente al complejo génico *iroquois*) y de provena L2, Knirps. Para activar ectópicamente la ruta JNK, sobre-expresamos bajo el control de *en-Gal4* una forma constitutivamente activa de la quinasa JNK de *Drosophila* denominada Hemipterous (Hep^{CA}). La línea *en-Gal4* dirige la expresión del *UAS-hep^{CA}* al compartimento posterior de los discos de ala. Encontramos que en el compartimento posterior de todos los discos examinados se produce la eliminación por completo de la señal del anticuerpo anti-Ara que marca la provena L5. Además, de forma no autónoma observamos que en el compartimento anterior se produce la eliminación o fuerte disminución de la expresión de Ara en la provena L3. La expresión de Knirps en la provena L2 no cambia respecto al control (Fig. R1 A, B, C y F).

Con el objetivo de examinar si esta pérdida de marcadores de especificación celular es un fenómeno específico de las células de provena, o por el contrario se trata de un mecanismo más general, estudiamos si también ésta afectaba a la especificación de las células de intervena. Para ello, examinamos la expresión del marcador de célula de intervena Blistered (Bs) mediante el reportero *bs^{P1292}-lacZ*. Observamos que en discos sometidos a sobre-expresión de *UAS-hep^{CA}* durante 24 h la expresión de *bs^{P1292}-lacZ* disminuye fuertemente tanto en las células de intervena

Resultados

del compartimento posterior como en las células adyacentes al borde A/P correspondientes a la región de intervena L3/L4. Estos resultados muestran que la activación ectópica de la ruta JNK es suficiente para producir la pérdida de marcadores de especificación celular tanto de provena como de intervena, de forma autónoma y no autónoma (Fig. R2 A y B).

En segundo lugar, examinamos el papel de la ruta JAK/STAT en la pérdida de marcadores de especificación celular. Para ello, activamos ectópicamente la ruta JAK/STAT durante 24 h mediante la sobre-expresión de una forma activada de la quinasa JAK de *Drosophila* Hopscotch (*hop^{tumt}*) bajo el control de *en-Gal4* y posteriormente analizamos la expresión de Ara, Knirps y Bs. Encontramos que en los discos *en-Gal4 UAS-hop^{tumt}* la expresión de Ara, Knirps y Bs era igual que en los discos controles. A continuación, inhibimos la ruta JAK/STAT mediante la sobre-expresión de una forma dominante negativa del receptor tipo IL-6 de *Drosophila* Domeless (*dome^{DN}*) y examinamos la expresión de estos marcadores. Observamos que en los discos *en-Gal4 UAS-dome^{DN}* tampoco se producen cambios en la expresión de Ara, Knirps ni Bs respecto a los discos controles. Los mismos resultados se obtuvieron inhibiendo la ruta JAK/STAT mediante la sobre-expresión de un ARN de interferencia específico para *hop*.

Por otro lado, analizamos la relación funcional que pueda existir entre las rutas de la JAK/STAT y la ruta de la JNK durante el proceso regenerativo. En primer lugar, analizamos si la ruta JNK activa a la ruta JAK/STAT. Para ello, activamos ectópicamente a la ruta JNK mediante la sobre-expresión de *UAS-hep^{CA}* bajo el control de *en-Gal4* en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario durante 16 h y 24 h, y posteriormente analizamos la activación de la ruta JAK/STAT mediante el reportero *10xSTAT-GFP*. Encontramos que tanto en los discos sometidos a sobre-expresión de *UAS-hep^{CA}* durante 16 h como 24 h se produce una activación de la expresión del reportero *10xSTAT-GFP* de forma autónoma en el compartimento posterior, siendo ésta más fuerte a las 24 h (Fig. R3). Estos resultados indican que la activación ectópica de la ruta JNK es suficiente para activar la ruta JAK/STAT en nuestras condiciones experimentales.

Para analizar si el incremento de la ruta de JAK/STAT en respuesta a la activación de la ruta JNK está mediando los cambios de especificación celular promovidos por la ruta JNK, sobre-expresamos *UAS-hep^{CA}* al mismo tiempo que inhibimos la ruta JAK/STAT mediante la sobre-expresión de *UAS-dome^{DN}* bajo el control de *en-Gal4*. Encontramos que la co-expresión de *UAS-dome^{DN}* y *UAS-hep^{CA}* durante 24 h elimina completamente la señal de Ara en la provena L5. Sin embargo, la expresión de Ara en la provena L3 nunca se elimina, a diferencia de lo observado en los discos *UAS-hep^{CA}* (Fig. R1 A, B, C, D y F). De forma similar, encontramos que en los discos sometidos a la co-expresión de *UAS-dome^{DN}* y *UAS-hep^{CA}* la expresión del reportero *bs^{P1292}-lacZ* se elimina en las células de intervena del compartimento posterior, pero

no desaparece por completo de las células de la intervena L3/L4 del compartimento anterior. La expresión de Knirps no se ve modificada respecto al control silvestre (Fig. R2 A, B, C y D). Estos datos sugieren que la ruta JAK/STAT podría tener un papel mediando la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK.

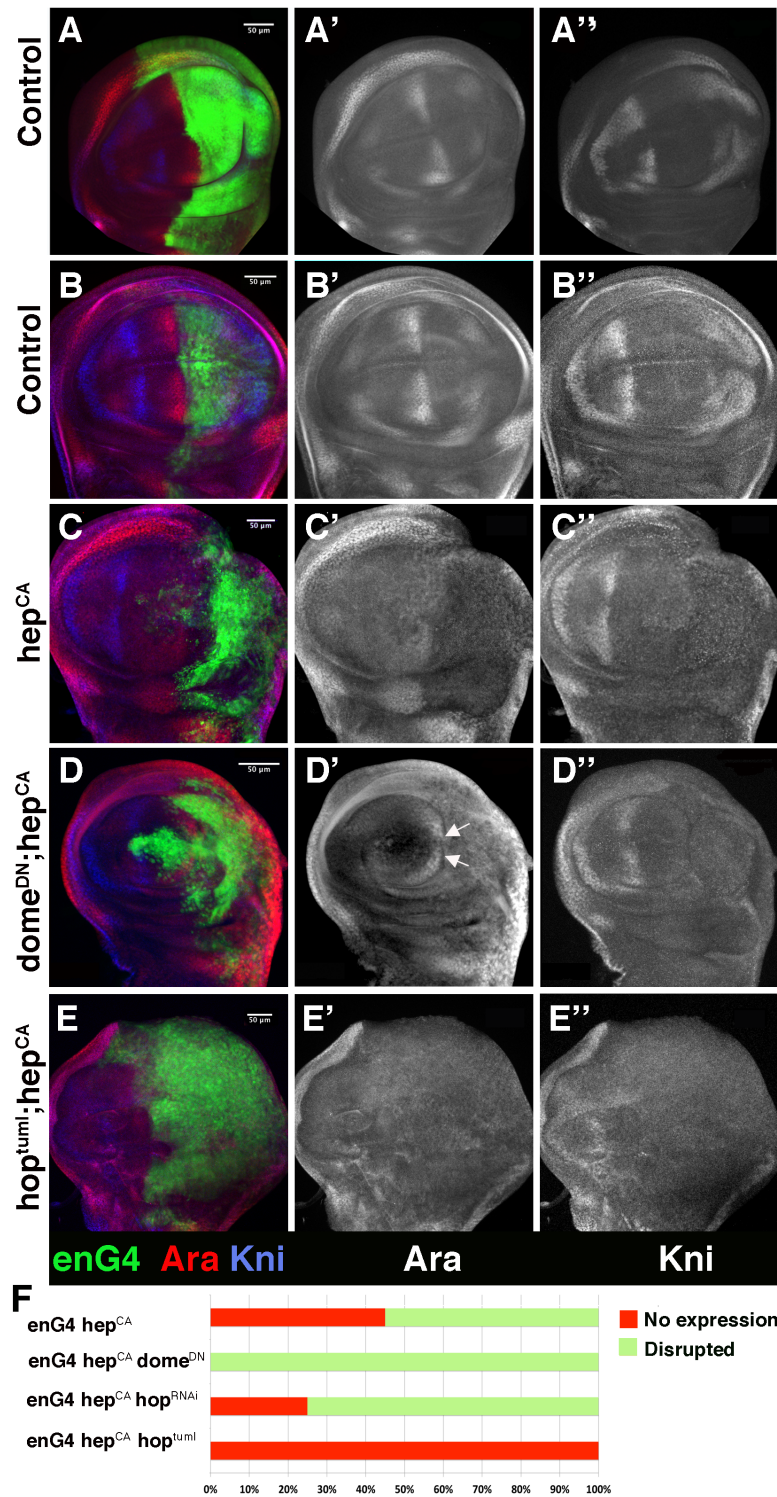


Figura R1. La ruta JAK/STAT media la pérdida no autónoma de marcadores de provena inducida por la activación ectópica de la ruta JNK. (A-E'') Los discos de ala de tercer estadio larvario fueron teñidos con anti-Ara (rojo en A-E, gris en A'-E') y anti-Knirs (azul en A-E, gris en A''-E''). (A-A'') Discos de ala control *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS}* 132+-12 h después de la eclosión del huevo (AEL). (B-B'') Discos de ala control *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS}* 156+-12 h AEL. (C-C'') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} tub-Gal80^{TS}* (D-D'') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-dome^{DN} UAS-hep^{CA} tub-Gal80^{TS}* (E-E'') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hop^{umt} UAS-hep^{CA} tub-Gal80^{TS}* (F) Cuantificación del porcentaje de discos de cada genotipo en función de tres criterios: expresión de Ara en provena L3 normal, expresión de Ara en provena L3 disminuida (verde claro) o ausencia de expresión de Ara en provena L3 (rojo). La sobre-expresión de *hep^{CA}* induce la pérdida del marcador Ara tanto de forma autónoma en el compartimento posterior como no autónoma en las células de la vena L3. Nótese que mientras que la co-expresión de *hep^{CA}* y *dome^{DN}* rescata la pérdida no autónoma de Ara en la vena L3, la co-expresión de *hep^{CA}* y *hop^{umt}* incrementa este efecto.

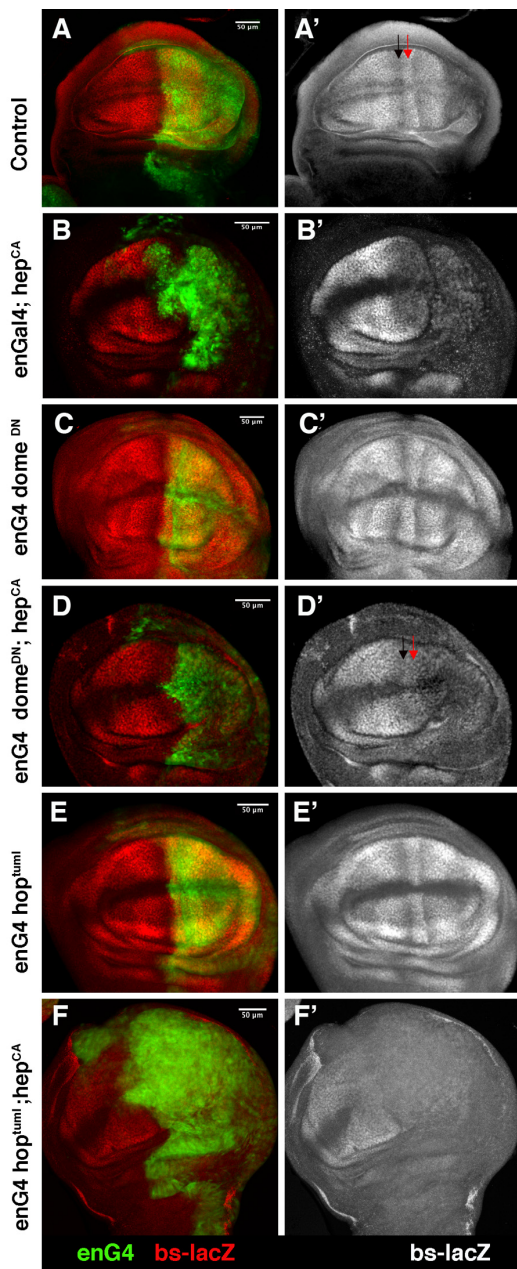


Figura R2. La ruta JAK/STAT media la pérdida no autónoma de marcadores de intervena inducida por la activación ectópica de la ruta JNK. (A-F) Los discos de ala de tercer estadio larvario fueron teñidos con anti-βGalactosidasa (rojo en A-F, gris en A'-F'). (A-A') Discos de ala control de tercer estadio larvario *en-Gal4 UAS-GFP bs^{P1292}-lacZ tub-Gal80^{TS}*. (B-B') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} bs^{P1292}-lacZ tub-Gal80^{TS}*. (C-C') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-dome^{DN} bs^{P1292}-lacZ tub-Gal80^{TS}*. (E-E') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-dome^{DN} UAS-hep^{CA} bs^{P1292}-lacZ tub-Gal80^{TS}*. (F-F') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hop^{umt} UAS-hep^{CA} bs^{P1292}-lacZ tub-Gal80^{TS}*. La sobre-expresión de *hep^{CA}* induce la pérdida del marcador de intervena *bs^{P1292}-lacZ* tanto de forma autónoma en el compartimento posterior como no autónoma en las células entre las venas L3 y L4. Nótese que mientras que la co-expresión de *hep^{CA}* y *dome^{DN}* rescata la pérdida no autónoma del marcador de intervena *bs^{P1292}-lacZ*, la co-expresión de *hep^{CA}* y *hop^{umt}* incrementa este efecto.

A continuación, examinamos si la co-activación de ambas rutas, JNK y JAK/STAT, podría incrementar este efecto. Para ello, activamos ectópicamente la ruta JNK mediante la sobre-expresión de *UAS-hep^{CA}* al mismo tiempo que sobre-expresamos *UAS-hop^{tm1}* bajo el control de *en-Gal4* durante 24 h. Observamos que en todos los discos analizados la expresión de Ara se elimina por completo tanto de la provena L5 como de la provena L3 (Fig. R1 E y E'). De forma similar, la expresión *bs^{P1292}-lacZ* desaparece en el compartimento posterior y en parte de las células de intervena del compartimento anterior (Fig. R2 F). Además, la expresión de Knirps en las células de la provena L2 también se reduce (Fig. R1 E y E''). Estos resultados apoyan el papel de la ruta JAK/STAT mediando la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK.

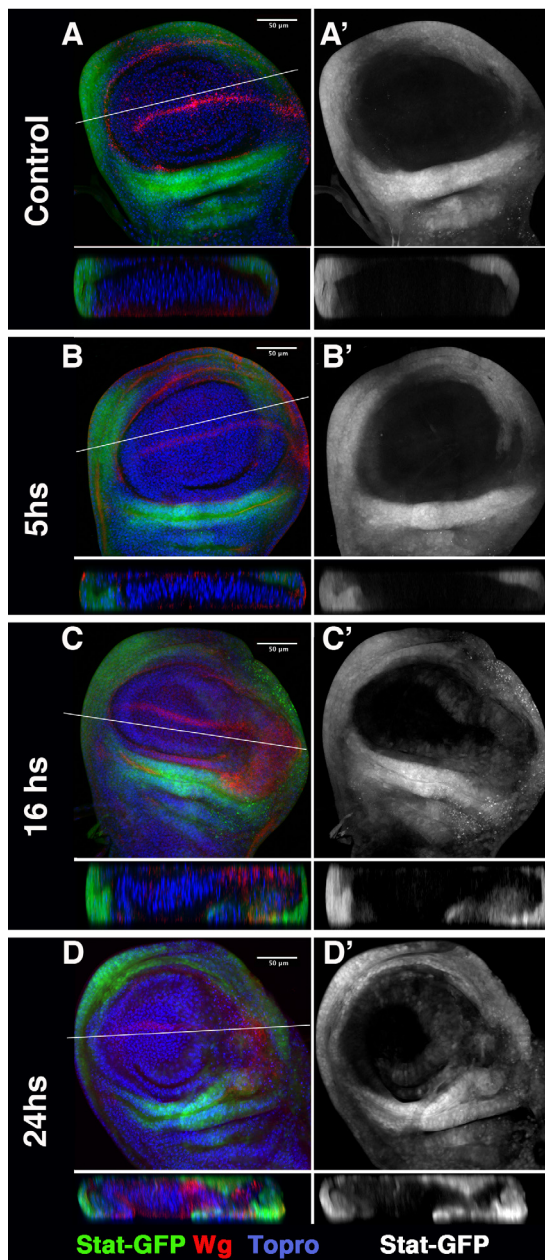


Figura R3. La activación ectópica de la ruta JNK activa la vía de señalización JAK/STAT. (A-D') Los discos de ala de tercer estadio larvario *en-Gal4 10XSTATGFP UAS-hep^{CA} tub-Gal80^{TS}* fueron teñidos con anti-Wingless (rojo en A-D) y TO-PRO (azul en A-D). Las larvas de tercer estadio se pasaron a 29°C durante 0 h (A-A'), 5 h (B-B'), 16 h (C-C') o 24 h (D-D'), y posteriormente se diseccionaron y tiñeron. La línea blanca indica la zona del corte transversal en cada caso.

Resultados

1.2. La activación de la ruta JNK bajo el control de *en-Gal4* durante 24 h se restringe principalmente al compartimento posterior.

Una posible explicación para la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK podría ser que el incremento de muerte celular en el compartimento posterior promoviera la activación de JNK en las células cercanas del compartimento anterior. Para examinar esta posibilidad, sobre-expresamos *UAS-hep^{CA}* bajo el control de *en-Gal4* durante 24 h, y posteriormente analizamos la activación de la ruta JNK mediante los reporteros de la vía *puc-LacZ* y *TRE-RFP*. Observamos que en todos los discos analizados tanto la expresión del reportero *puc-LacZ* (Fig. R8 A, A' y C) como de *TRE-RFP* (Fig. R4) se restringe principalmente al compartimento posterior, encontrando únicamente marcada alguna célula del compartimento anterior cercana al borde A/P. Estos resultados indican que la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK en el compartimento posterior no se debe a la activación no autónoma de JNK.

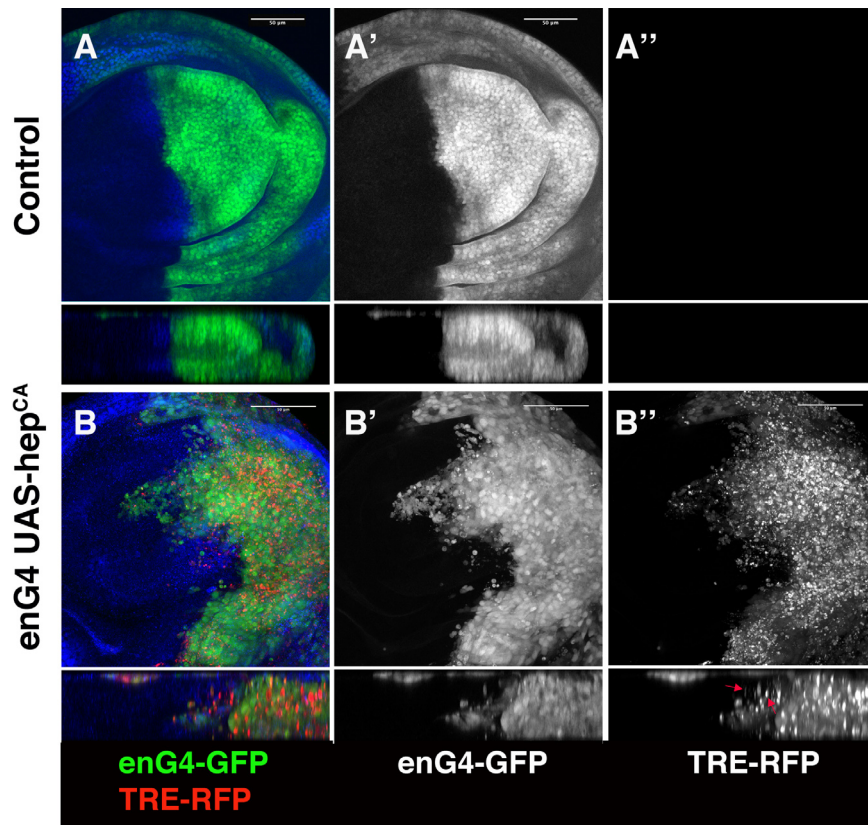


Figura R4. La expresión del reportero *TRE-RFP* se restringe principalmente al compartimento posterior en discos *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} TRE-RFP*. (A-A'') Discos de la control *en-Gal4 UAS-GFP TRE-RFP*. (B-B'') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} TRE-RFP*. Nótese que la expresión del reportero de la ruta JNK se restringe principalmente al compartimento posterior (marcaje en verde con GFP), observándose únicamente alguna célula no GFP marcada con RFP.

1.3. La pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular inducida por JNK es parcialmente independiente de su función apoptótica

La ruta JNK está implicada en procesos muy diferentes, como por ejemplo la proliferación celular, migración, diferenciación, regeneración y respuesta inflamatoria (Bergantiños et al., 2010; M. Bosch et al., 2005; Igaki et al., 2006; M. Wu et al., 2010). Entre todas sus funciones, esta ruta destaca como una de las vías más importantes de activación de la apoptosis (Kanda & Miura, 2004). Además, estudios previos han mostrado que las células apoptóticas secretan señales que inducen tanto la división celular como la muerte celular en las células vecinas (Pérez-Garijo, 2018; Pérez-Garijo et al., 2013; Pérez-Garijo & Steller, 2015). Por lo tanto, la pérdida de marcadores de especificación celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK podría deberse a la activación de la apoptosis.

Con el objetivo de analizar esta posibilidad, en primer lugar, caracterizamos el patrón de muerte celular en nuestras condiciones experimentales mediante el uso de un anticuerpo que reconoce la forma activada de la caspasa efectora de *Drosophila* Dcp1. Observamos que en los discos sometidos a la sobre-expresión de *UAS-hep^{CA}* se produce un fuerte incremento de la apoptosis (Fig. R5 C'' y R6 C''), como ya había sido descrito en varios trabajos. Sin embargo, cuando inhibimos la ruta JAK/STAT (*dome^{DN}*) a la vez que activamos ectópicamente JNK (*hep^{CA}*) la muerte celular aumenta respecto a los discos que sólo sobre-expresan *UAS-hep^{CA}* (Fig. R5 C'' y D''). Por el contrario, en los discos en los que activamos ectópicamente ambas rutas JNK (*hep^{CA}*) y JAK/STAT (*hop^{tm1}*) la muerte celular se reduce respecto a los discos que sólo sobre-expresan *UAS-hep^{CA}* (Fig. R6 C'' y D''). Estos resultados indican que JNK es capaz de inducir la pérdida de marcadores de especificación celular a pesar de la disminución de la apoptosis, como se observa en el caso de los discos *en-Gal4 UAS-hop^{tm1} UAS-hep^{CA}*.

En segundo lugar, activamos ectópicamente la ruta JNK durante 24 h bajo el control de *en-Gal4* a la vez que inhibimos la apoptosis mediante un microARN que impide la función de los genes proapoptóticos *rpr*, *hid* y *grim* (microARN-RHG). Encontramos que la apoptosis provocada por la sobre-expresión de *hep^{CA}* se reduce por completo al co-expresar el *microARN-RHG* (Fig. R5 C'', R6 C'' y R7 A''), sin embargo la expresión de Ara se elimina por completo de la provena L5 en el compartimento posterior y parcialmente en la provena L3 del compartimento anterior (Fig. R7 D' y G). La expresión de Knirps no se modifica en ningún caso (Fig. R7 C'' y D''). Estos resultados sugieren que el papel de la ruta JNK induciendo la pérdida de marcadores de especificación celular es parcialmente independiente de la apoptosis.

Por último, examinamos si la inducción de apoptosis reproducía los efectos de pérdida de

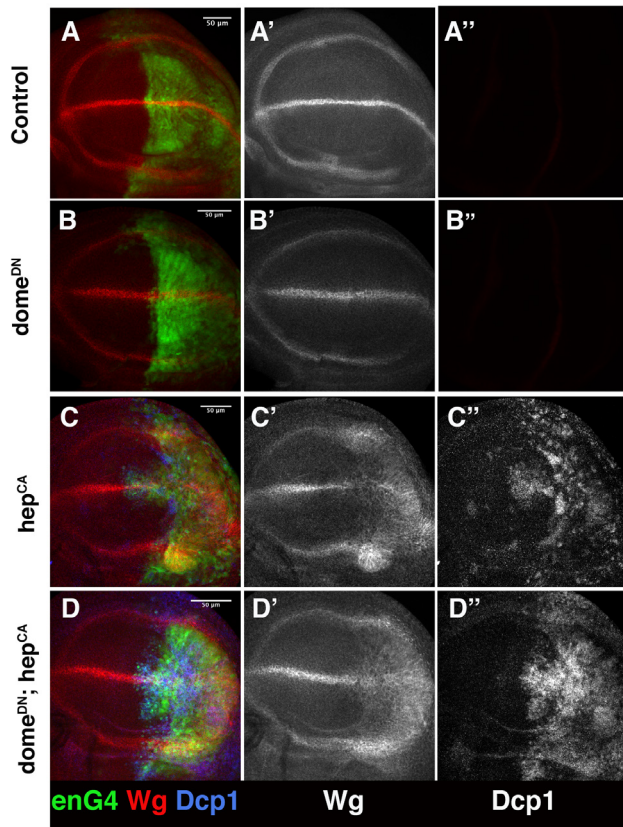


Figura R5. La inhibición de la ruta JAK/STAT discos sometidos a la sobre-expresión de la ruta JNK aumenta la muerte celular por apoptosis. (A-D') Los discos de ala de tercer estadio larvario fueron teñidos con anti-Dcp1 activada (azul en A-D y gris en A''-D'') y anti-Wg (rojo en A-D y gris en A'-D'). (A-A'') Discos control *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS}*. (B-B'') Discos *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS} UAS-dome^{DN}*. (C-C'') Discos *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA}*. (D-D'') Discos *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA} UAS-dome^{DN}*. La apoptosis aumenta en los discos sometidos a la sobre-expresión de *hep^{CA}* y *dome^{DN}* comparado con los discos en los que únicamente se sobre-expresa *hep^{CA}*.

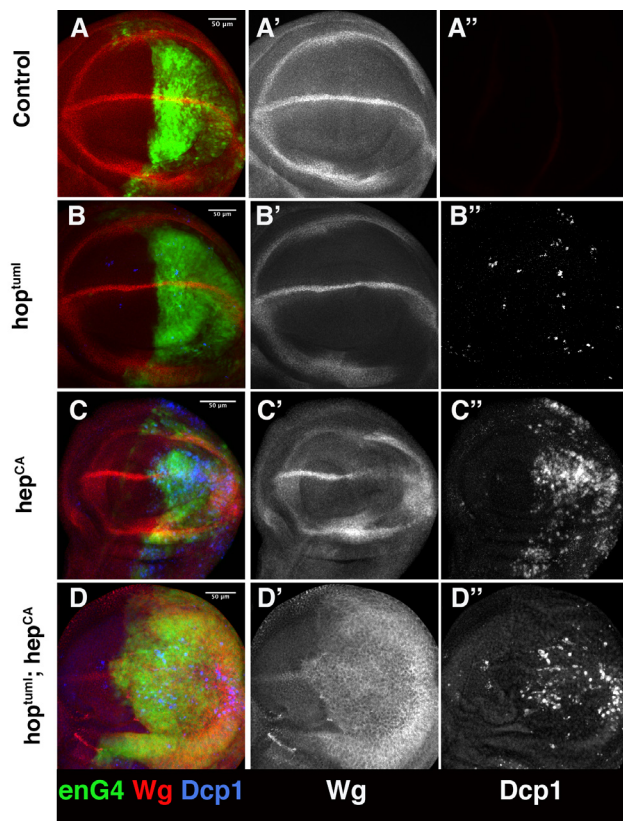


Figura R6. La co-expresión de las rutas JAK/STAT y JNK suprime parcialmente la apoptosis causada por la activación ectópica de la ruta JNK. (A-D') Los discos de ala de tercer estadio larvario fueron teñidos con anti-Dcp1 activada (azul en A-D y gris en A''-D'') y anti-Wg (rojo en A-D y gris en A'-D'). (A-A'') Discos control *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS}*. (B-B'') Discos *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS} UAS-hop^{uml}*. (C-C'') Discos *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA}*. (D-D'') Discos *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA} UAS-hop^{uml}*. La apoptosis se reduce en los discos sometidos a la sobre-expresión de *hep^{CA}* y *hop^{uml}* comparado con los discos en los que únicamente se sobre-expresa *hep^{CA}*.

marcadores de especificación celular observados tras la activación ectópica de la ruta JNK. Para ello sobre-expresamos el gen pro-apoptótico *rpr* bajo el control de *en-Gal4* durante 24 h, y posteriormente analizamos la expresión de Ara y Knirps. Observamos que en estas condiciones, la expresión de Ara se elimina por completo en la provena L5 del compartimento posterior. Sin embargo, la expresión en la provena L3 del compartimento anterior no se modifica respecto a los discos control (Fig. R7 F y F'). La expresión de Knirps no varía (Fig. R7 F y F''). Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de *rpr* durante 24 h no es suficiente para inducir la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular observada tras la activación ectópica de JNK.

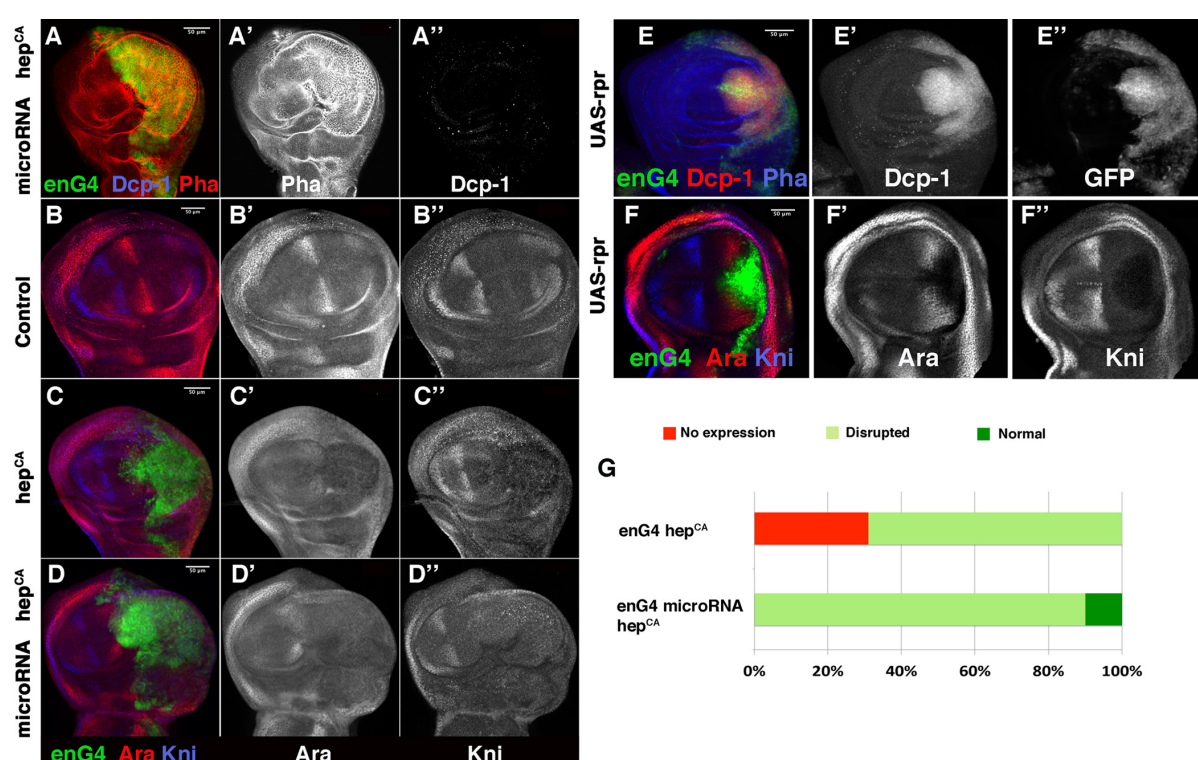


Figura R7. La activación ectópica de la ruta JNK induce la pérdida no autónoma del marcador Ara en la provena L3 de manera parcialmente independiente de su función apoptótica. (A-A'') Discos de ala de tercer estadio larvario *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} UAS-microARN RHG tub-Gal80^{TS}* teñidos con Faloidina (rojo en A y gris en A') y Dcp1 (azul en A y gris en A''). La sobre-expresión de *UAS-microARN RHG* suprime la apoptosis causada por la activación ectópica de la ruta JNK. (B-B'') Discos de ala control. (C-C'') Discos de ala de tercer estadio larvario *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} tub-Gal80^{TS}*. (D-D'') Discos de ala de tercer estadio larvario *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} UAS-microARN RHG tub-Gal80^{TS}*. La sobre-expresión de *UAS-microARN RHG* rescata parcialmente la pérdida no autónoma del marcador Ara en la provena L3. (E-F'') Discos de ala de tercer estadio larvario *en-Gal4 UAS-GFP UAS-rpr tub-Gal80^{TS}* sometidos a la sobre-expresión de *UAS-rpr* durante 24 h y teñidos con anti-Ara (rojo en F, gris en F'), anti-Knirps (azul en F, gris en F''), Faloidina (azul en E) y anti-Dcp1 proteolizada (rojo en E y gris en E'). Nótese que la sobre-expresión de *UAS-rpr* durante 24 h induce altos niveles de apoptosis (E y E''), pero no causa ningún efecto en la expresión del marcador Ara en

Resultados

la provena L3 (F y F''). (G) Cuantificación del porcentaje de discos de cada genotipo en función de tres criterios: expresión de Ara en provena L3 normal (verde oscuro), expresión de Ara en provena L3 disminuida (verde claro) o ausencia de expresión de Ara en provena L3 (rojo).

Nuestros resultados parecen contradecir estudios previos que han mostrado que la caspasa iniciadora Dronc activa a la ruta JNK y a p53, creando un mecanismo de retroalimentación positiva que asegura la destrucción de la célula una vez que se ha iniciado el proceso de muerte celular (Shlevkov & Morata, 2012; Wells et al., 2006). Una posible explicación para que la sobre-expresión de *rpr* no reproduzca los efectos de pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular podría ser que la sobre-expresión de *rpr* durante 24 h no es suficiente para activar niveles efectivos de la ruta JNK que permitieran inducir estos cambios de especificidad celular. Para estudiar esta posibilidad, comprobamos si la ruta JNK se activa tras la sobre-expresión de *rpr* bajo el control de *en-Gal4* durante 24 h. Encontramos que en los discos sometidos a la sobre-expresión de *rpr* durante 24 h la expresión del reportero *puc-LacZ* es menor que en los discos en los que se activa ectópicamente JNK (*hep^{CA}*) durante el mismo tiempo (Fig. R8). A continuación, estudiamos si la inducción de apoptosis durante más tiempo (48 h) podría reproducir los efectos de pérdida de marcadores de especificación celular observados tras la activación ectópica de la ruta JNK durante 24 h. Encontramos que en todos los discos sometidos a la sobre-expresión de *rpr* durante 48 h bajo el control de *en-Gal4* se elimina por completo la expresión de Ara en la provena L3 del compartimento anterior (Fig. R9 B'). Estos resultados muestran que la sobre-expresión de *rpr* durante 48 h es suficiente para reproducir la pérdida de marcadores de especificación celular observada tras la activación ectópica de JNK.

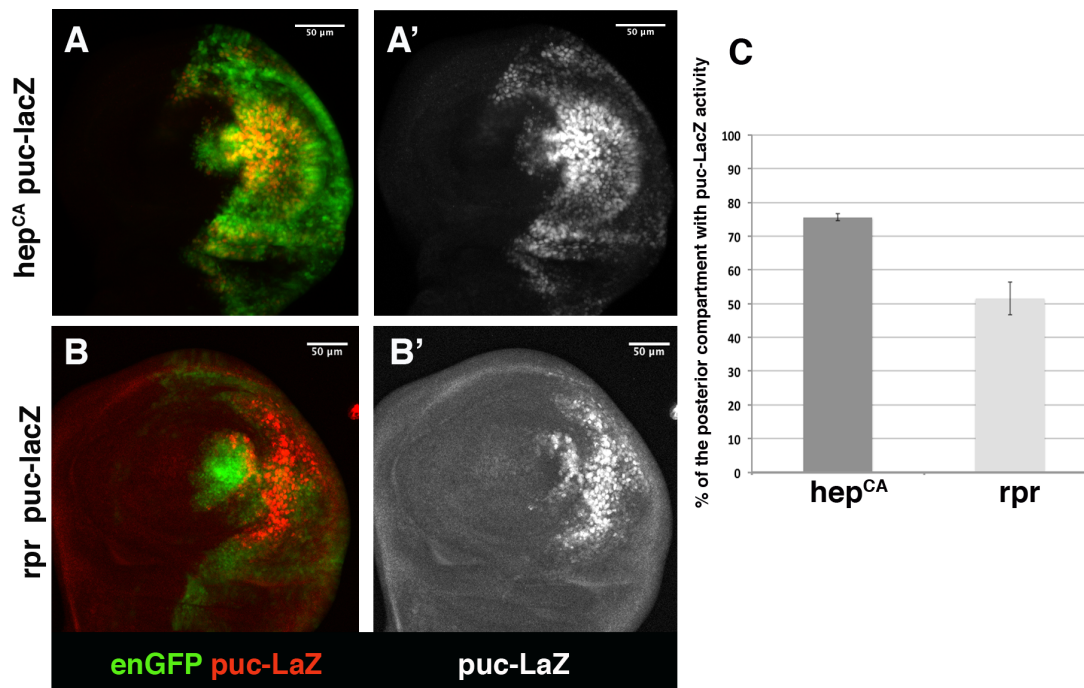


Figura R8. La activación ectópica de *rpr* induce la expresión de *puc-LacZ*. (A-B') Los discos de ala de tercer estadio larvario fueron teñidos con anti-β-Galactosidasa (rojo en A-B y gris en A'-B'). (A-A') Discos control *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} tub-Gal80^{TS} puc-LacZ*. (B-B') Discos *en-Gal4 UAS-GFP UAS-rpr tub-Gal80^{TS} puc-LacZ*. (C) Cuantificación de la intensidad del marcaje con anti-β-Galactosidasa en los distintos genotipos. Las barras de error representan errores estándar. Nótese que el porcentaje del área del compartimento posterior marcado con el anti-β-Galactosidasa es menor en los discos sometidos a la sobre-expresión de *rpr* comparados con los discos *UAS-hep^{CA}*.

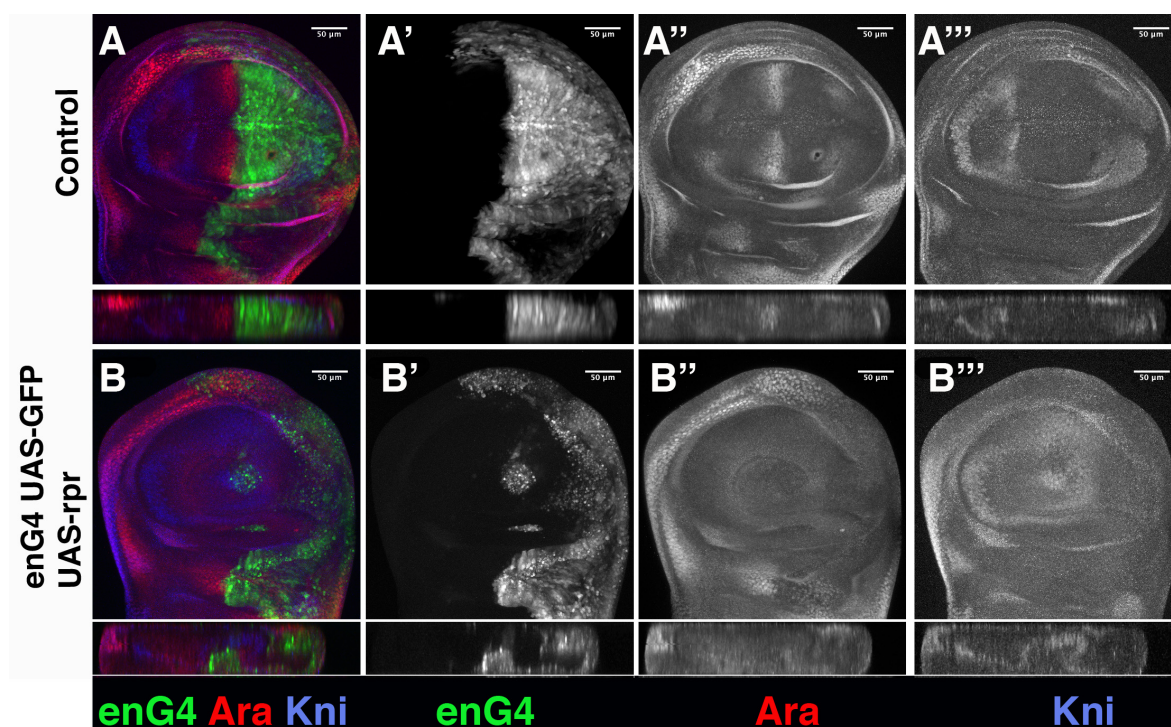


Figura R9. La activación ectópica de *UAS-rpr* durante 48 h induce la pérdida del marcador de especificidad celular Ara en la provena L3. Discos de ala control *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS}* (A-A''') y *en-Gal4 UAS-GFP UAS-rpr tub-Gal80^{TS}* (B-B''') de tercer estadio larvario teñidos con anti-Ara (rojo en A-B y gris en A''-B'') y anti-Knirs (azul en A-B y gris en A'''-B''').

1.4. La pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular inducida por JNK es dependiente de Dronc.

La ruta de la JNK promueve la apoptosis mediante la activación de la expresión de los genes pro-apoptóticos *rpr* y *hid*. La expresión de estos genes induce apoptosis a través de Dronc que es la única caspasa iniciadora identificada en *Drosophila*. Estudios previos han mostrado que esta caspasa está implicada en multitud de procesos independientes de la muerte celular, como

Resultados

por ejemplo la proliferación compensatoria en el disco imaginal de ala, la diferenciación de las espermátidas o la migración celular en el ovario (Geisbrecht & Montell, 2004; Huh, Vernooy, et al., 2004; Kondo et al., 2006). En base a estos datos, Dronc podría estar regulando la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK.

Con el objetivo de examinar esta posibilidad, activamos ectópicamente la ruta JNK mediante la sobre-expresión de *hep*^{CA} bajo el control de *hh-Gal4* durante 24 h en mutantes heteroalélicos para *dronc* (*dronc*^{I24}/*dronc*^{I29}). Encontramos que en estos discos mutantes la muerte celular se reduce respecto a los discos control (*dronc*^{I24}/*dronc*^{I29}) (Fig. R10 C', D' y E). La expresión de Ara en la provena L5 del compartimento posterior se elimina por completo. Sin embargo, observamos que la expresión de Ara en la provena L3 de todos los discos analizados no se modifica respecto a los discos control (Fig. R11 A' y B'). Estos resultados sugieren que la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK depende parcialmente de Dronc.

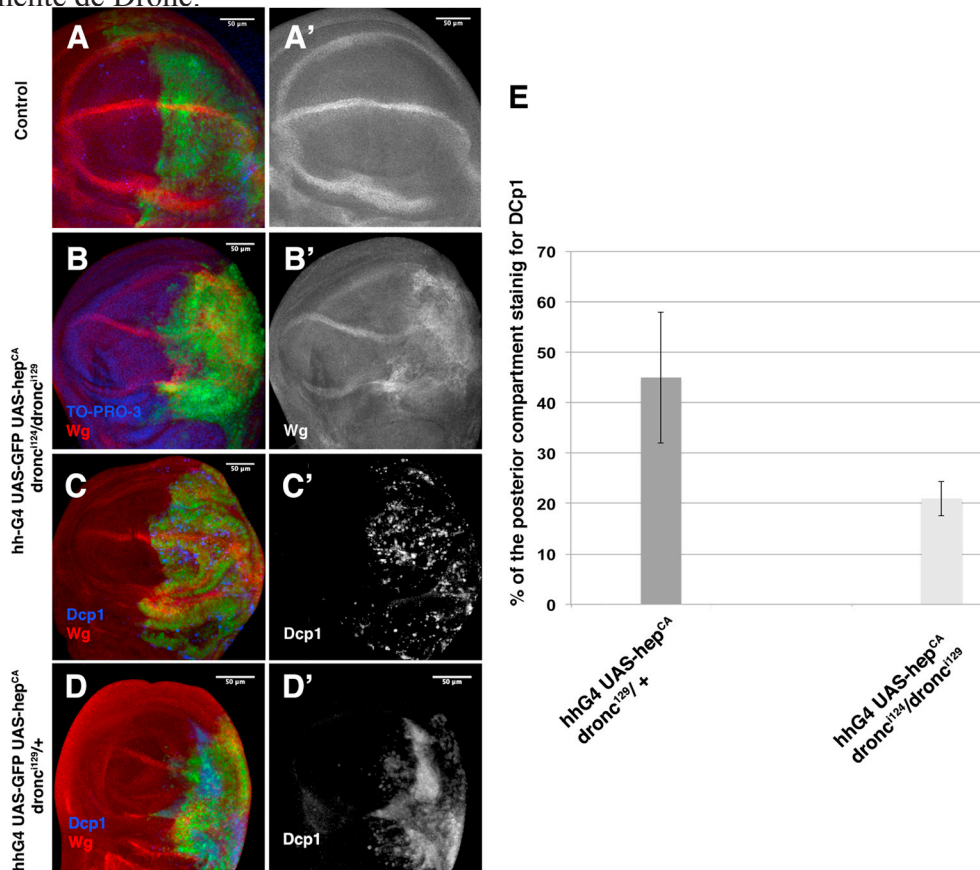


Figura R10. La eliminación de *dronc* suprime parcialmente la apoptosis causada por la activación ectópica de la ruta JNK. (A-B') Los discos de ala de tercer estadio larvario fueron teñidos con anti-Wg (rojo en A-B y gris en A'-B') y To-Pro-3 (azul en B). (C-D') Discos de ala teñidos con anti-Wg (rojo en C-D) y anti-Dcp1 activada (azul en C-D y gris en C'-D'). (A-A') Discos de ala control. (B-C') Discos *hh-Gal4 UAS-GFP UAS-hep*^{CA} *tub-Gal80*^{TS} *dronc*^{I24}/*dronc*^{I29}. (D-D') Discos *hh-Gal4 UAS-GFP UAS-*

hep^{CA} tub-Gal80^{TS} droncⁱ²⁹/+. (E) Cuantificación del marcaje con anti-Dcp1 activada ($p < 0.0001$).

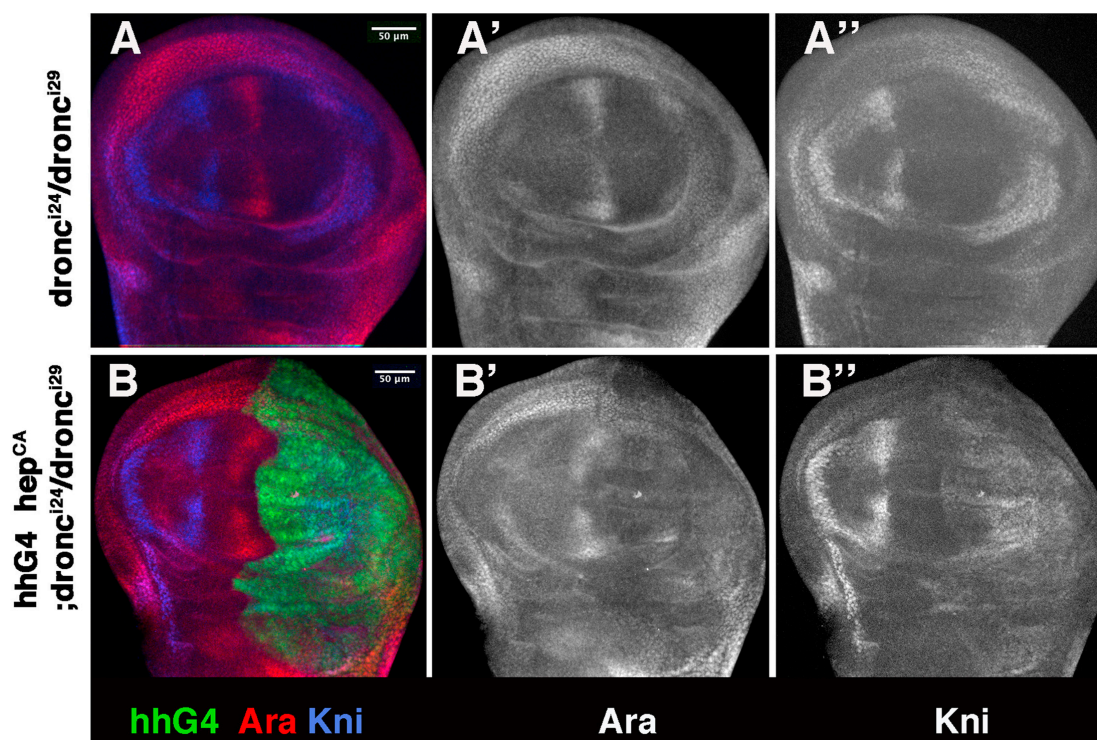


Figura R11. La pérdida del marcador Ara en la provena L3 causada por la activación ectópica de la ruta JNK depende de Dronc. Discos de ala control *dronci29/dronci24* (A-A'') y *hh-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} tub-Gal80^{TS} dronci24/dronci29* de tercer estadio larvario teñidos con anti-Ara (rojo en A y B, gris en A' y B') y anti-Knirs (azul en A y B, gris en A'' y B''). Nótese que la expresión del marcador Ara en la provena L3 es similar en ambos casos.

1.5. La re-especificación celular inducida por las rutas JNK y JAK/STAT es independiente del papel del morfógeno Dpp en la determinación del patrón del ala.

Trabajos previos han mostrado que Dpp tiene una función fundamental en el desarrollo del patrón de venas e intervenas, mediante la regulación de la expresión de los genes *spalt*, *knirps* y el complejo *iroquois* (Blair, 2007; Martín et al., 2017).

Dpp se activa en una franja de células cercana al borde A/P en respuesta a la señal del morfógeno Hh, secretado por las células del compartimento posterior. Por otro lado, se ha demostrado que la ruta JNK puede activar a la ruta de Dpp (Glise & Noselli, 1997; Hou et al., 1997). Por lo tanto, la pérdida de marcadores de especificación celular causada por la sobre-expresión de *hep^{CA}* en

Resultados

el compartimento posterior podría deberse a que estuviéramos interfiriendo con la señalización de Hh y Dpp, alterando así el posicionamiento de las células de provena e intervena a lo largo del borde A/P.

Para examinar esta posibilidad, analizamos si la sobre-expresión de *hep^{CA}* bajo el control de *en-Gal4* incrementaba los niveles de anti-FosfoMad (pMad) y anti-Spalt mayor, proteínas codificadas por dos de los genes diana de la ruta de Dpp. Observamos que el dominio de expresión de pMad se expande por todo el compartimento posterior. Sin embargo, los niveles de expresión de pMad y Spalt mayor no presentan diferencias significativas respecto al control en el compartimento anterior (Fig. R12).

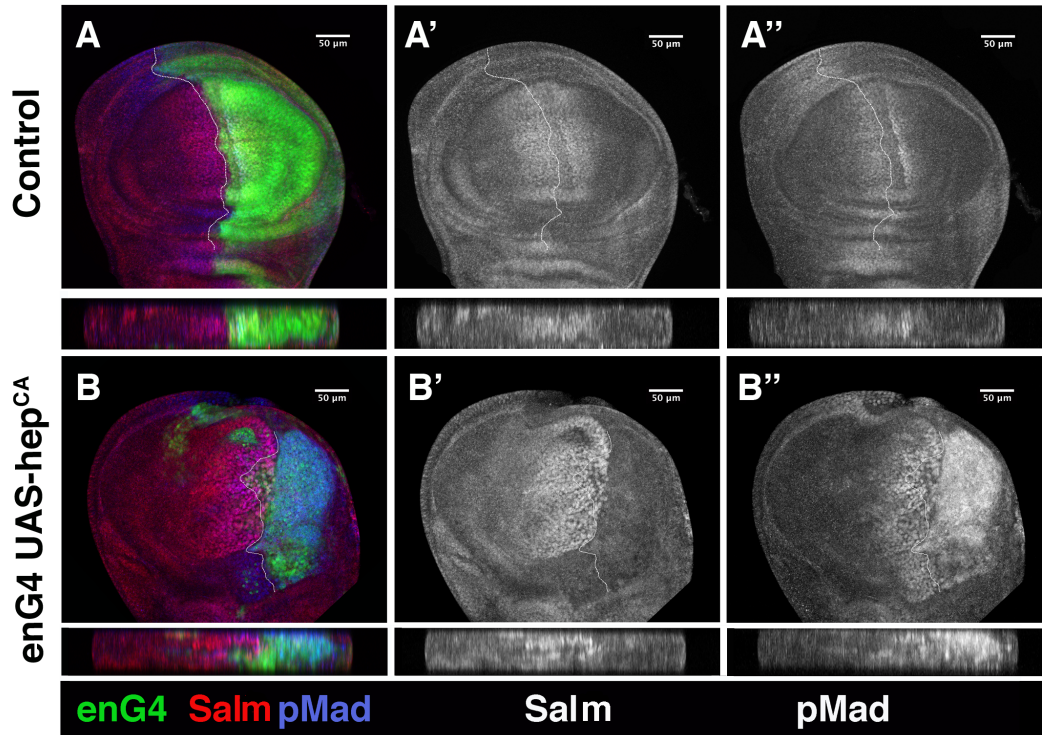


Figura R12. La activación ectópica de la ruta JNK en el compartimento posterior no afecta a la actividad de Dpp en el borde A/P. Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS}* control (A-A'') y *en-Gal4 UAS-GFP UAS-hep^{CA} tub-Gal80^{TS}* (B-B'') de tercer estadio larvario teñidos con anti-Salm (rojo en A y B, gris en A' y B') y anti-pMad (azul en A y B, gris en A'' y B'').

Además, analizamos los efectos al sobre-expresar *hep^{CA}* en el compartimento dorsal de discos de tercer estadio larvario bajo el control de *apterous-Gal4* (*ap-Gal4*). De esta forma, podíamos examinar si los efectos en la especificación celular observados se debían a alteraciones en la información posicional establecida por el borde A/P o a una señal más general. Encontramos que en discos en los que hemos sobre-expresado a *UAS-hep^{CA}* durante 24 h en el compartimento dorsal (*ap-Gal4*) la señal del anticuerpo anti-Ara que marca la provena L3 y L5 se elimina por completo del compartimento dorsal y se reduce fuertemente en el compartimento ventral (Fig.

R13).

Estos resultados sugieren que los efectos de cambios de especificación celular observados al activar JNK no dependen de la función de Dpp como organizador del posicionamiento de las células de provena e intervena a lo largo del borde A/P.

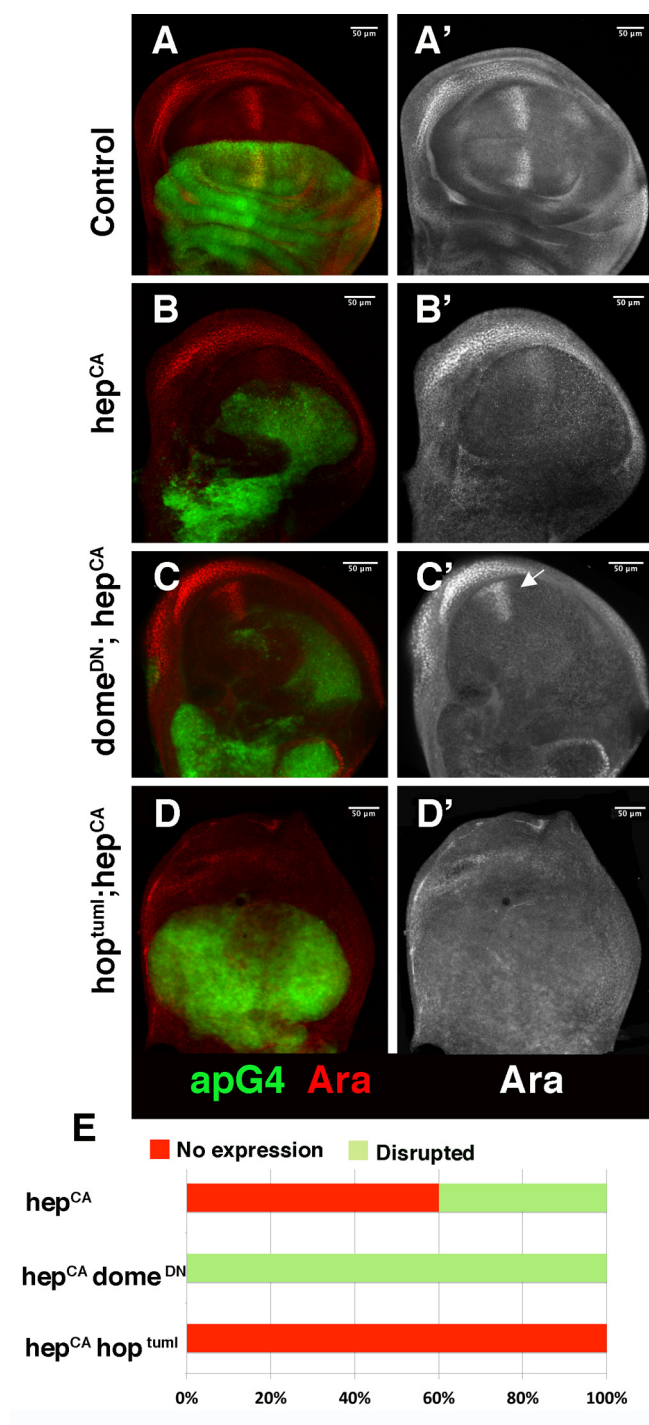


Figura R13. La activación ectópica de la ruta JNK bajo el control de *ap-Gal4* induce la pérdida de marcadores de provena tanto de forma autónoma como no autónoma. (A-D') Los discos de ala de tercer estadio larvario fueron teñidos con anti-Ara (rojo en A-D y gris en A'-D'). (A-A') Discos control *ap-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS}*. (B-B') Discos *ap-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA}*. (C-C') Discos *ap-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA} UAS-dome^{DN}*. (D-D') Discos *ap-Gal4 UAS-GFP tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA} UAS-hop^{tnum1}*. (E) Cuantificación del porcentaje de discos de cada genotipo en función de tres criterios: expresión de Ara en provena L3 normal, expresión de Ara en provena L3 disminuida (verde claro) o ausencia de expresión de Ara en provena L3 (rojo).

2. PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR APOPTOSIS EN DISCOS IMAGINALES DE ALA TRAS LA METAMORFOSIS

2.1. Caracterización del patrón de división celular en discos imaginales de ala de pupa tras la inducción de apoptosis

Estudios previos indican que tras la inducción de apoptosis en discos imaginales durante los estadios larvarios se activa la división en las células vecinas para mantener la homeostasis del tejido. Esta proliferación compensatoria que ocurre durante el desarrollo larvario contribuye a la regeneración del tejido. Se ha propuesto que la capacidad regenerativa de los discos imaginales se pierde entre el final del tercer estadio larvario y la entrada en pupación (Bergantiños et al., 2010; Harris et al., 2016; Katsuyama et al., 2015; Narbonne-Reveau & Maurange, 2019; Santabárbara-Ruiz et al., 2015; Smith-Bolton et al., 2009). Sin embargo, no se conoce hasta qué momento del desarrollo se mantiene la capacidad proliferativa de las células de los discos tras la inducción de un daño. Para definir este momento, activamos ectópicamente la apoptosis en discos imaginales de ala a distintos tiempos DFP, y analizamos el patrón de división celular. Para estudiar la respuesta proliferativa, utilizamos el anticuerpo anti-Fosfo-Histona 3 (PH3) que marca células en la fase M del ciclo celular y analizamos el índice mitótico de discos de ala pupales tras la inducción de apoptosis.

Como primera aproximación, utilizamos la irradiación de pupas con rayos X para inducir apoptosis en los discos de ala a distintos tiempos DFP. Irradiamos pupas silvestres de 0 h, 10 h y 20 h DFP, y las diseccionamos 20 h más tarde para analizar el índice mitótico de los discos de ala a las 20 h, 30 h y 40 h DFP respectivamente (Fig. R14).

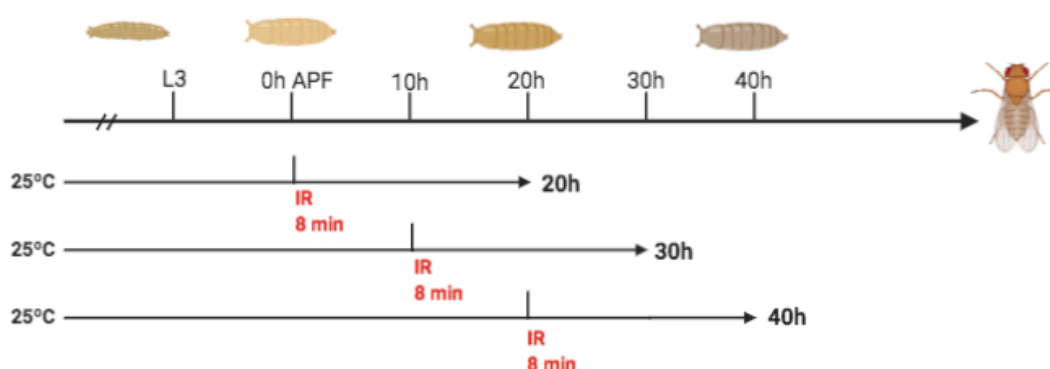


Figura R14. Protocolo de irradiación con rayos X de pupas. En el diseño experimental mostrado se irradian pupas silvestres de 0 h, 10 h y 20 h DFP a 4000R durante 8 minutos y 16 segundos (marcado en rojo). Las pupas se diseccionan 20 h más tarde para analizar el índice mitótico de los discos de ala a las 20 h, 30 h y 40 h DFP respectivamente. Los animales se mantienen a 25°C durante todo el proceso.

Observamos que en los discos controles no irradiados de 20 h DFP hay células proliferando, y que esta proliferación aumenta en los discos irradiados de la misma edad (Fig. R15 A, B y G). Sorprendentemente, encontramos que el incremento del número de células en división se mantiene a las 30 h DFP pese a que en los discos controles todas las células han salido del ciclo celular (Fig. R15 C, D y H). A las 40 h DFP ni los discos controles ni los irradiados muestran proliferación celular (Fig. R15 E, F e I). Estos resultados sugieren que el daño inducido por la irradiación podría prolongar el periodo proliferativo hasta las 30 h DFP.

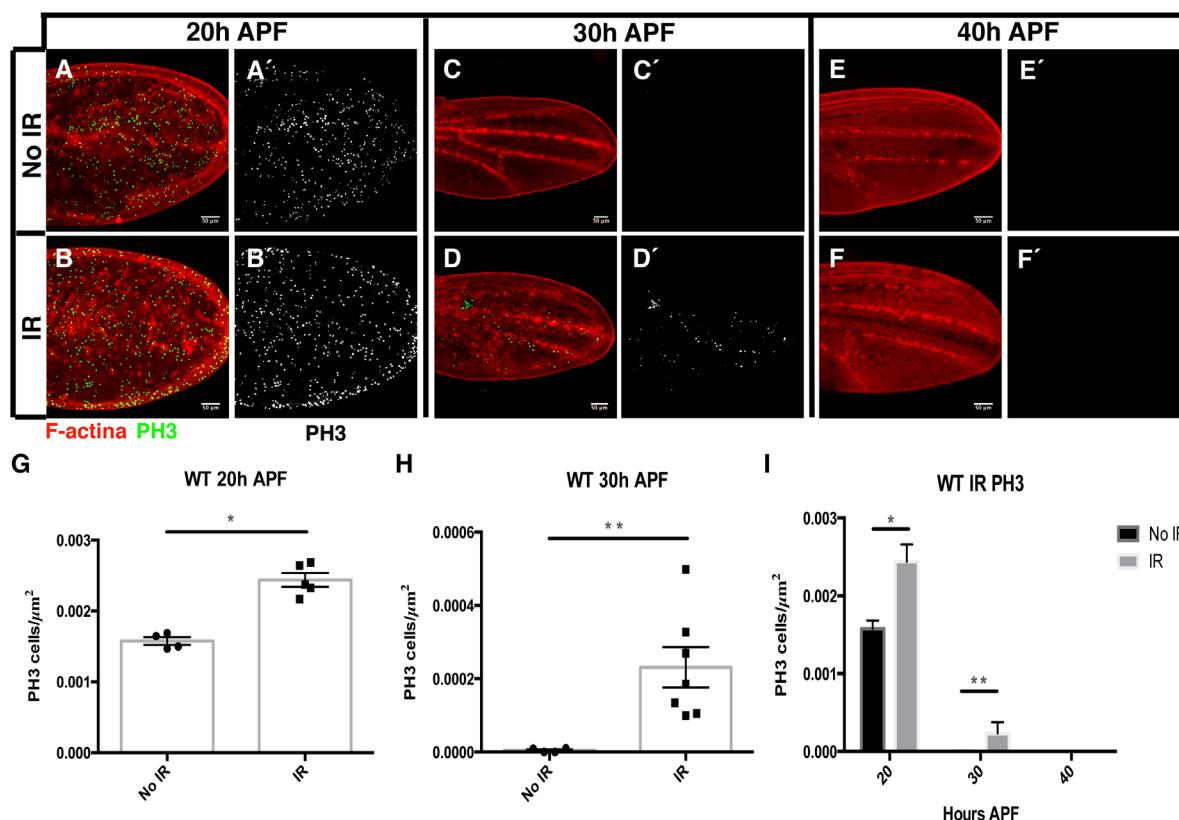


Figura R15. Respuesta proliferativa en el disco de ala ante la irradiación con rayos X DFP. (A-F') Patrón de proliferación celular tras la irradiación de discos de ala a distintas horas DFP. Los discos de ala de pupas silvestres fueron teñidos con el anticuerpo anti-PH3 (en verde en A-F, y en gris en A'-F') y Faloidina que se une a los filamentos de F-actina (en rojo en A-F). (G-I) Cuantificación del índice mitótico de los discos irradiados y no irradiados a las 20 h DFP (G) y a las 30 h DFP (H). (A-E') Discos de ala controles de 20 h DFP (A-A'), 30 h DFP (C-C') y 40 h DFP (E-E'). (B-F') Discos de ala irradiados de 20 h DFP (B-B'), 30 h DFP (D-D') y 40 h DFP (F-F'). Nótese que mientras que en los discos controles de 30 h DFP no hay células dividiéndose, en los discos irradiados de 30 h DFP la proliferación celular se mantiene. La respuesta proliferativa de las células del disco de ala a la irradiación finaliza entre las 30 h y las 40 h DFP. Las barras de error representan errores estándar (* p-valor<0,05; ** p-valor<0,005).

La ausencia de respuesta proliferativa a las 40 h DFP tras la irradiación podría deberse a que durante el periodo pupal las células dejan de ser sensibles a la irradiación, por lo que no se estaría induciendo muerte celular. Para analizar esta posibilidad irradiamos pupas silvestres de

Resultados

0 h y 20 h DFP y las diseccionamos 20 h más tarde, para analizar la respuesta apoptótica de los discos de ala a las 20 h y 40 h DFP respectivamente. Para detectar las células apoptóticas utilizamos el anticuerpo anti-Dcp1. Encontramos que en los discos de 20 h DFP irradiados a las 0 h DFP se produce un incremento significativo del número de células apoptóticas respecto a los discos controles (Fig. R16 A y B). Sin embargo, las células de los discos de 40 h DFP, irradiados a las 20 h DFP no se mueren (Fig. R16 C y D). Se ha propuesto que la irradiación de larvas de tercer estadio larvario induce apoptosis en el disco de ala desde las 4 h hasta las 24 h después de la irradiación (Qi & Calvi, 2016). En nuestro diseño experimental comprobamos que en discos pupales de 40 h, esa respuesta no se da. Sin embargo, no podemos descartar que en las células de los discos de ala irradiados a las 20 h DFP no se dé una respuesta inmediata, de manera que la apoptosis se incremente inmediatamente tras la irradiación.

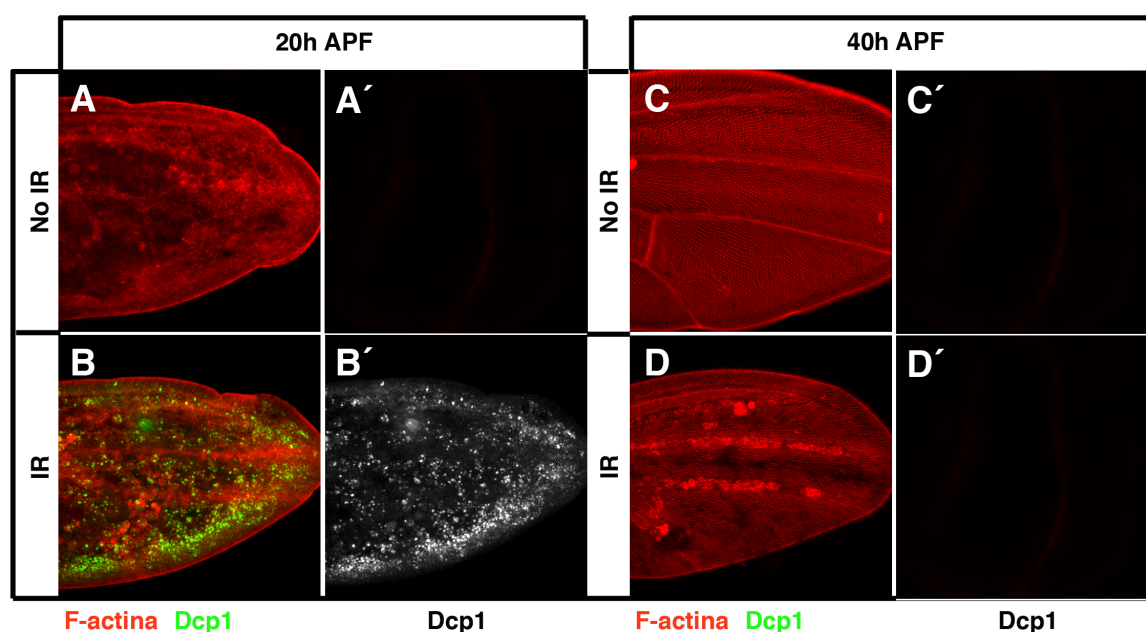


Figura R16. Respuesta apoptótica en el disco de ala ante la irradiación con rayos X DFP. (A-D') Respuesta apoptótica tras la irradiación de discos de ala DFP. Los discos de ala de pupa silvestres fueron teñidos con el anticuerpo anti-Dcp1 (en verde en A-D, y en gris en A'-D') y Faloidina (en rojo en A-D). Se irradiaron pupas de 0 h y 10 h DFP a 4000R durante 8 minutos y 16 segundos. Se diseccionaron 20 h más tarde, a las 20 h y 40 h DFP para analizar la respuesta apoptótica de las células a la irradiación. (A-A') Discos de ala controles sin irradiar de 20h DFP y (C-C') 40 h DFP. (B-B') Discos de ala irradiados de 20 h DFP y (D-D') 40 h DFP. Nótese que la irradiación induce apoptosis de forma generalizada en las células de los discos de 20 h DFP pero no en los de 40 h DFP.

Para establecer si la ausencia de respuesta proliferativa a las 40 h DFP se debe a la imposibilidad de inducir apoptosis con rayos X, decidimos utilizar un sistema alternativo para inducir muerte celular. Para ello, empleamos el sistema binario Gal4/UAS en combinación con Gal80^{ts} para

inducir apoptosis mediante la sobre-expresión de un gen pro-apoptótico. La ablación genética se indujo mediante la sobre-expresión del gen *rpr* a distintos tiempos DFP en el compartimento posterior del ala, para ello utilizamos la línea *hh-Gal4*. En nuestras condiciones experimentales el desarrollo de *Drosophila* tiene lugar 1.2 veces más rápido a 29°C que a 25°C, y 2.5 veces más despacio a 17°C que a 25°C (ver Materiales y Métodos). Todos los tiempos de incubación han sido ajustados a sus equivalentes si el desarrollo se hubiera producido a 25°C. Seleccionamos pupas de 0 h DFP y las mantuvimos a 17°C hasta el equivalente a 0-10 h DFP a 25°C. Posteriormente, las pasamos a 29°C para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 20 h, 25 h, 30 h y 35 h DFP a 25°C, momento en el que las diseccionamos para analizar la respuesta proliferativa (Fig. R17).

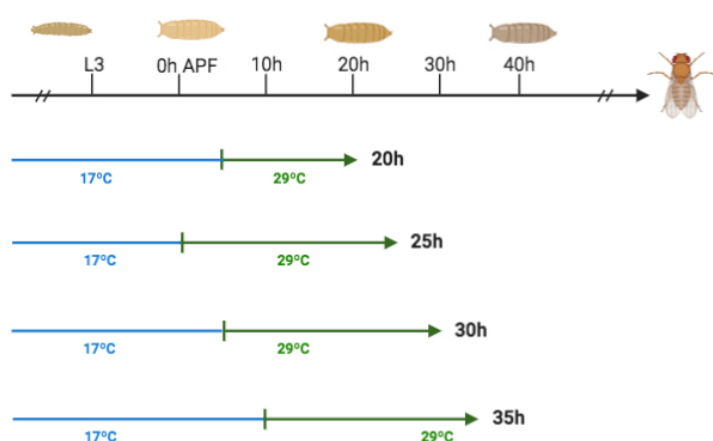


Figura R17. Representación del protocolo de ablación genética. Se seleccionaron pupas de 0 h DFP y se mantuvieron a 17°C (en azul) hasta el equivalente a 0-10h DFP a 25°C. Posteriormente, se pasaron a 29°C (en verde) para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 20 h, 25 h, 30 h y 35 h DFP a 25°C, momento en el que se diseccionaron para analizar la respuesta proliferativa de los discos de ala.

En primer lugar, observamos que en discos de 20 h DFP sometidos al protocolo indicado se produce un fuerte incremento de la proliferación en todo el disco (Fig. R18 A, B e I). En discos de 25 h DFP se produce un aumento de la proliferación respecto al control, y ésta se restringe a las células próximas a la zona dañada (Fig. R18 C, D y J). Durante este período, se producen las dos últimas rondas de división celular en los discos controles. De manera similar a lo observado en los discos irradiados, el incremento de la proliferación en respuesta a la sobre-expresión de *rpr* se mantiene en discos más tardíos, 30 h DFP, pese a que en este momento las células de los discos controles ya han salido del ciclo celular (Fig. R18 E, F y K). Cuando inducimos muerte desde las 10 h DFP hasta las 35 h DFP, los discos son más pequeños pero no observamos ninguna respuesta proliferativa (Fig. R18 G, H e I). El hecho de que los discos sean de menor tamaño, debido a una reducción del compartimento posterior sugiere que, a diferencia de la irradiación, la sobre-expresión de *rpr* sí es capaz de inducir apoptosis en las células de los discos de pupa tardía, a las 35 h DFP. Este resultado sugiere que la falta de respuesta proliferativa a partir de las 35-40 h DFP no se debe a la incapacidad de inducir muerte celular.

Resultados

Estos resultados indican que las células del disco de ala sometidas a irradiación o ablación genética desde estadios tempranos del desarrollo de pupa (antes de las 24 h DFP) pueden entrar en división hasta las 30 h DFP. Lo que sugiere que se está prolongando el período proliferativo de las células del ala pupal mediante la inducción de daño.

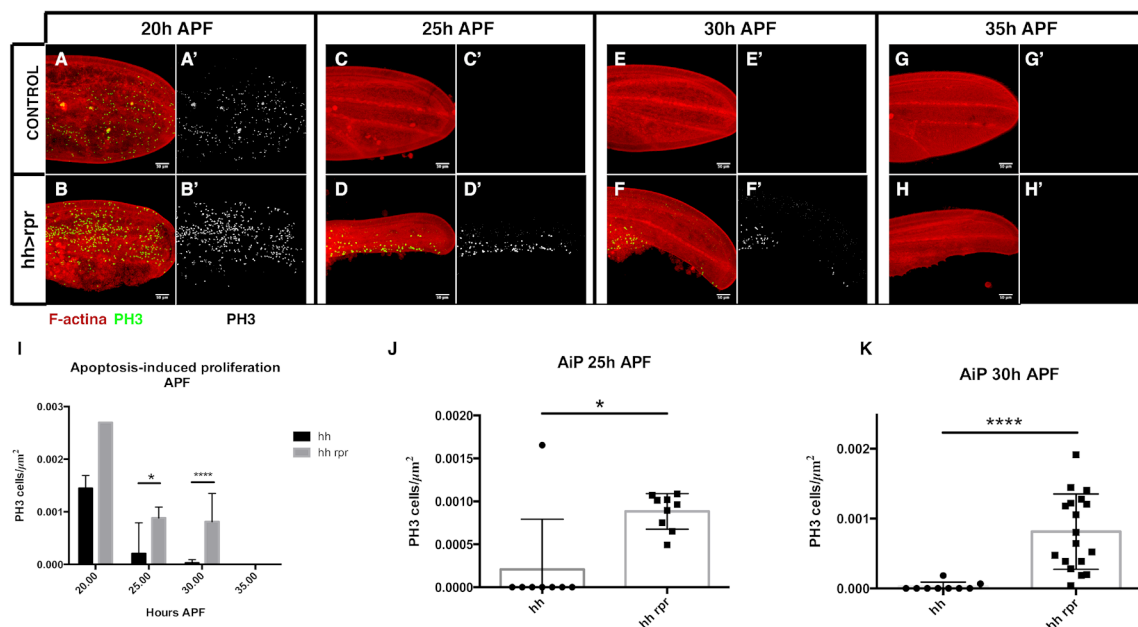


Figura R18. Proliferación inducida por apoptosis en el disco imaginal de ala DFP. (A-H') Patrón de proliferación celular tras la ablación genética de discos de ala a distintas horas DFP. Los discos de ala de pupa *UAS-rpr; hh-Gal4; tub-Gal80^{ts}* fueron teñidos con el anticuerpo anti-PH3 (en verde en A-H, y en gris en A'-H') y Faloidina (en rojo en A-H). (I-K) Cuantificación del índice mitótico de los discos sometidos a ablación genética a distintos tiempos DFP. (A-G') Discos de ala controles de 20 h DFP (A-A'), 25 h DFP (C-C'), 30 h DFP (E-E') y 35 h DFP (G-G'). (B-H') Discos de ala sometidos a la inducción de apoptosis de 20 h DFP (B-B'), 25 h DFP (D-D'), 30 h (F-F') y 35 h DFP (H-H'). Nótese que mientras que en los discos controles de 30 h DFP no hay células dividiéndose, en los discos de 30 h DFP sometidos a la sobre-expresión de *rpr* la proliferación celular se mantiene. La proliferación inducida por apoptosis en el disco de ala finaliza a las 35 h DFP. Las barras de error representan errores estándar (* p-valor<0,05; **** p-valor<0,0005).

La salida del ciclo celular en los discos pupales se produce a las 24 h DFP (Buttitta et al., 2007; O'Keefe et al., 2012). La inducción de daño en los experimentos anteriores (Fig. R15, R16 y R18), tanto mediante la activación ectópica del gen *rpr* como mediante irradiación con rayos X se realizó antes de las 24 h DFP (Fig. R14 y R17). Es decir, la inducción de daño se produjo en el período en el que las células del disco de ala son mitóticamente activas. De manera, que nuestros resultados son compatibles con que el daño podría estar provocando que se prolongara el período proliferativo de células mitóticamente activas. Con el objetivo de averiguar si las células post-mitóticas pueden ser estimuladas a re-entrar en el ciclo celular en respuesta a la inducción de apoptosis, sobre-expresamos el gen pro-apoptótico *rpr* bajo el control de *sal^{EP/V}*.

LHG en discos de pupa a partir de las 24 h DFP y analizamos el índice mitótico. Observamos que en los discos de 30 h DFP sometidos a ablación genética durante 6 h a partir de las 24 h DFP la proliferación no presenta diferencias significativas respecto a los discos controles (Fig. R19 C y D).

Estos datos indican que la inducción de apoptosis en las células de los discos imaginales de ala que han concluido el proceso de división normal durante el desarrollo no es capaz de inducir la re-entrada masiva de las células en el ciclo celular.

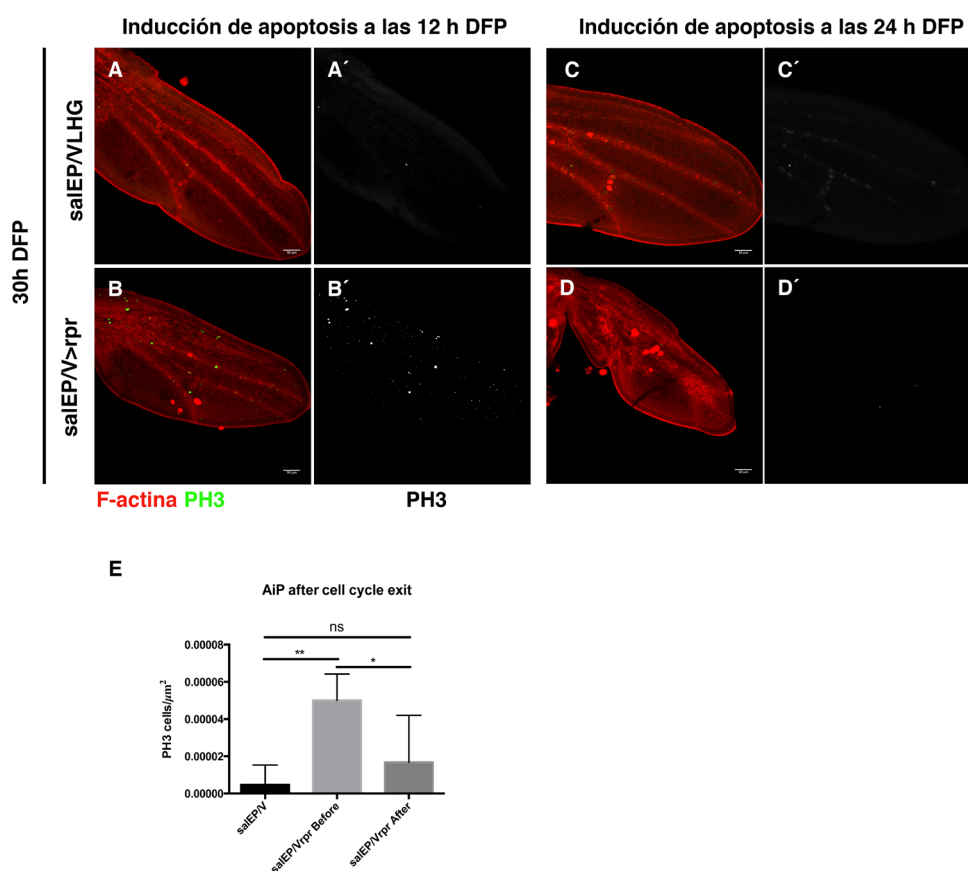


Figura R19. Respuesta proliferativa ante la ablación genética del dominio Sal después de la salida del ciclo celular en pupa. (A-H') Patrón de proliferación celular tras la ablación genética de discos de ala antes (12 h DFP) y después (24 h DFP) de la salida de las células del disco de ala del ciclo celular. Los discos de ala de pupa *sal^{EP/V}-LHG lexO-rpr tub-Gal80^{ts}* fueron teñidos con el anticuerpo anti-PH3 (en verde en A-D , y en gris en A'-D') y Faloidina (en rojo en A-D). (E) Cuantificación del índice mitótico de los discos de 30 h DFP sometidos a ablación genética antes y después de la salida de las células del ciclo celular a las 24 h DFP. (A-C') Discos de ala controles. (B-D') Discos de ala sometidos a la inducción de apoptosis antes (B-B') y después (D-D') de la salida de las células del disco de ala del ciclo celular. Nótese que mientras que la inducción de ablación genética antes de las 24 h DFP activa la proliferación celular en los discos de 30 h DFP comparados con los controles, la sobre-expresión de *rpr* a las 24 h DFP prácticamente no activa la división celular en los discos de 30 h DFP. Las barras de error representan errores estándar (* p-valor<0,05; ** p-valor<0,005; ns, no significativo).

Resultados

2.2. Posible papel de Ciclina E como factor limitante de la proliferación inducida por apoptosis en pupa

Se ha propuesto que la salida del ciclo celular durante el desarrollo pupal se debe a que el regulador del ciclo CycE deja de funcionar y se produce un incremento de la actividad del factor RB (Buttitta et al., 2007). RB desfosforilado o hipofosforilado se une a E2F inhibiendo la transcripción de sus genes diana, necesarios para la transición G1-S, como por ejemplo *cycE*. CycE fosforila e inhibe a RB, promoviendo la transición G1-S. La retroalimentación positiva que existe entre CycE y E2F durante el desarrollo larvario se mantiene hasta las 30 h DFP. De manera que aunque la salida del ciclo se produce a las 24 h DFP, la sobre-expresión de sólo CycE o sólo E2F puede inducir división celular hasta las 30 h DFP. Curiosamente la salida del ciclo no es irreversible, de forma que si se co-expresan *cycE* y *e2f* a partir de las 30 h DFP las células diferenciadas continúan proliferando hasta, al menos, las 40-44 h DFP (Buttitta et al., 2007, 2010). Es posible que a partir de las 30 h DFP las señales mitogénicas producidas por las células apoptóticas sólo activen a CycE/Cdk2 o a E2F, con lo que el sistema de retroalimentación entre CycE y E2f no se activaría y la división no se induciría. Para analizar esta posibilidad, sobre-expresamos *e2f1 dp* o *cycE* al mismo tiempo que inducimos apoptosis a partir de las 26-30 h DFP y estudiamos la respuesta proliferativa de las células de los discos a las 46-50 h DFP. Dado que la irradiación no induce apoptosis en las células de los discos de ala de pupa tardíos, decidimos utilizar el método de ablación genética para inducir muerte celular.

Utilizamos el sistema UAS/Gal4/Gal80ts combinado con LHG/LexOp para sobre-expresar *cycE* o *e2f1* a la vez que inducíamos ablación genética. Este sistema nos permite inducir muerte celular bajo el control de *sal^{EP/V}-LHG* al mismo tiempo que sobre-expresamos *e2f1 dp* o *cycE* en el compartimento anterior con *ci-Gal4*. Seleccionamos pupas de 0 h DFP y las mantuvimos a 17°C hasta el equivalente a 26-30 h DFP a 25°C. Posteriormente, las pasamos a 29°C para activar la expresión ectópica de *e2f1 dp* y *rpr* hasta el equivalente a 46-50 h DFP a 25°C, momento en el que las diseccionamos para analizar la respuesta proliferativa en el disco de ala (Fig. R20). En los discos analizados no encontramos división celular en ningún caso (Fig. R21 A, B, C, E y G).

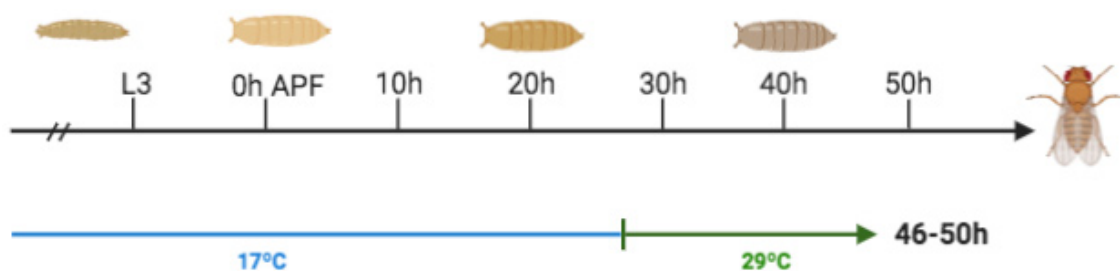
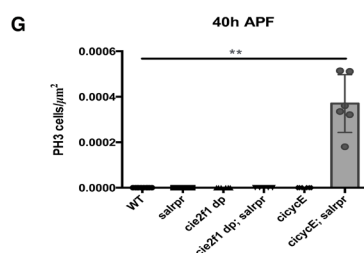
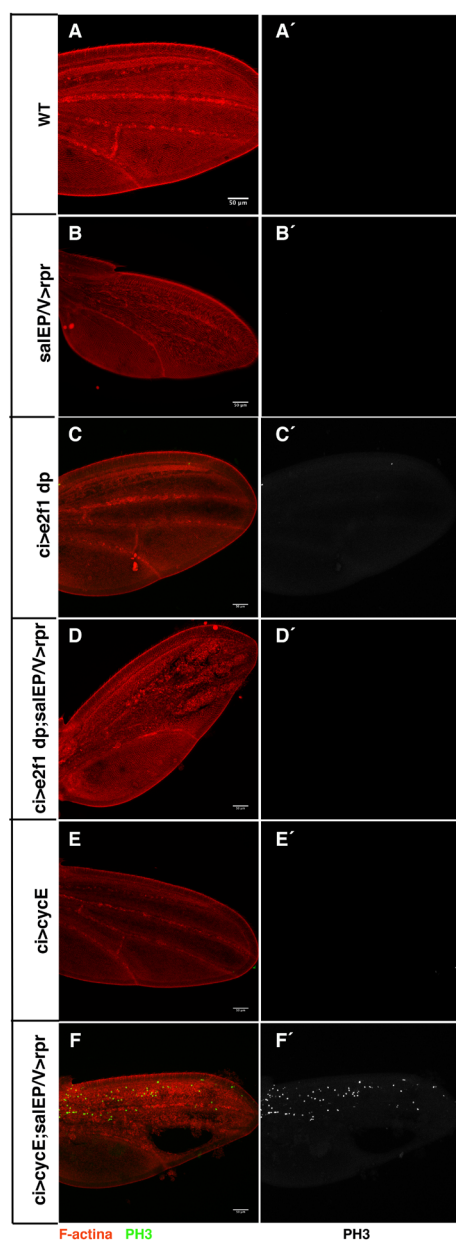


Figura R20. Protocolo de ablación genética y sobre-expresión de *cycE* o *e2f1*. Los animales *sal^{EP/V}-LHG lexOrpr ci-Gal4 UAS-cycE tub-Gal80^{ts}* o *sal^{EP/V}-LHG lexOrpr ci-Gal4 UAS-e2f1 UAS-dp tub-Gal80^{ts}* se mantuvieron a 17°C desde la puesta y posteriormente se seleccionaron pupas de 0 h DFP. Las pupas se mantuvieron a 17°C hasta el equivalente a 26-30 h DFP a 25°C. A continuación se cambiaron a 29°C para activar la expresión de *rpr* y *cycE* o *rpr* y *e2f1 dp* hasta el equivalente a 46-50 h DFP a 25°C, momento en el que se diseccionaron.



Siguiendo el mismo protocolo activamos ectópicamente la muerte celular bajo el control de *sal^{EP/V}-LHG* al mismo tiempo que sobre-expresamos *cycE* en el compartimento anterior con *ci-Gal4* (Fig. R20). Observamos que la co-expresión de *rpr* y *cycE* a partir de las 26 h DFP es capaz de inducir división celular hasta, al menos, las 46 h DFP (Fig. R21 D y G). La sobre-expresión de *rpr* o *cycE* por separado no activa la proliferación celular a las 46 h DFP (Fig. R21 B, E y G).

Estos resultados sugieren que las señales mitogénicas producidas por las células apoptóticas podrían estar activando a E2F pero no a CycE a partir de las 26 h DFP, siendo *cycE* el factor limitante para la proliferación inducida por apoptosis DFP. De esta manera, las señales mitogénicas emitidas por las células apoptóticas serían insuficientes para activar el sistema de retroalimentación entre E2F y CycE en los discos de ala de pupa tardíos, con lo que la proliferación sólo se produciría cuando se induce daño y se sobre-expresa *cycE* al mismo tiempo.

Figura R21. CycE como posible factor limitante de la AiP DFP_ (A-H') Los discos de ala de pupa fueron teñidos con el anticuerpo anti-PH3 (en verde en A-F, y en gris en A'-F') y Faloidina (en rojo en A-F). (G) Cuantificación del índice mitótico de discos de 46-50 h DFP sometidos a distintas condiciones experimentales. (H) Representación del protocolo de ablación genética. Se seleccionaron pupas de 0 h DFP y se mantuvieron a 17°C (en azul) hasta el equivalente de 26-30 h DFP

Resultados

a 25°C. Posteriormente, se pasaron a 29°C (en verde) para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 46-50 h DFP a 25°C, momento en el que se diseccionaron para analizar la respuesta proliferativa de los discos de ala. (A-A') Discos de ala controles, (B-B') discos *sal^{EP/V}LHG lexO-rpr tub-Gal80^{TS}*, (C-C') discos *sal^{EP/V}LHG Ci-Gal4 UAS-e2f1 UAS-dp tub-Gal80^{TS}*, (D-D') *sal^{EP/V}LHG Ci-Gal4 lexO-rpr UAS-e2f1 UAS-dp tub-Gal80^{TS}*, (E-E') *sal^{EP/V}LHG Ci-Gal4 UAS-cycE tub-Gal80^{TS}*, (F-F') *sal^{EP/V}LHG lexO-rpr Ci-Gal4 UAS-cycE tub-Gal80^{TS}*. Nótese que únicamente en los discos sometidos a la sobre-expresión de *rpr* y *cycE* la proliferación celular se mantiene hasta las 46-50 h DFP. La barra de error representa error estándar (** p-valor<0,005).

Sorprendentemente, cuando irradiamos y sobre-expresamos *e2f1* o *cycE* en el disco de ala encontramos resultados similares a los observados al activar ectópicamente la apoptosis y sobre-expresar *e2f1* o *cycE*, a pesar de que hemos descrito que la irradiación no incrementa la muerte celular a partir de las 20 h DFP (Fig. R16). Para realizar estos experimentos, seleccionamos pupas de 0 h DFP y las pasamos a 29°C para inducir la sobre-expresión de *e2f1 dp* o *cycE* bajo el control de *en-Gal4* que dirige su expresión al compartimento posterior. A continuación, irradiamos las pupas a dos tiempos diferentes, 0 h o 25 h, y diseccionamos discos de ala 25 h más tarde, a las 25 h o a las 50 h respectivamente, para analizar la respuesta proliferativa (Fig. R22 F y R23 F). Observamos que en los discos irradiados de 25 h DFP que sobre-expresan *e2f1 dp* o *cycE* se produce un aumento del índice mitótico en todo el disco, a diferencia de los discos sin irradiar que sobre-expresan estos genes, en los que el incremento de proliferación se restringe al compartimento posterior (Fig. R22 y R23, A y B). Los discos irradiados de 50 h DFP sometidos a la sobre-expresión de *e2f1 dp* no muestran proliferación celular (Fig. R22 C y D). Curiosamente, en los discos irradiados de 50 h DFP que sobre-expresan *cycE* encontramos un aumento de la proliferación celular exclusivamente en el compartimento posterior, comparado con los discos controles sin irradiar sometidos a la sobre-expresión de *cycE* en los que no hay división celular (Fig. R23 C y D). Estos resultados sugieren que a pesar de que las células del disco de ala sometidas a irradiación a las 25 h DFP no se mueren por apoptosis a las 50 h DFP, las señales de daño inducidas por la irradiación sí se activan. La inhibición de la apoptosis en discos de ala de pupa tardíos sería “downstream” de las señales de daño. De esta manera, la sobre-expresión de *cycE* en discos irradiados proporcionaría las dos señales necesarias (daño y sobre-expresión de *cycE*) para re-activar la retroalimentación positiva entre CycE y E2F y la división celular, pero la sobre-expresión de *cycE* sólo no sería suficiente (Fig. R24).

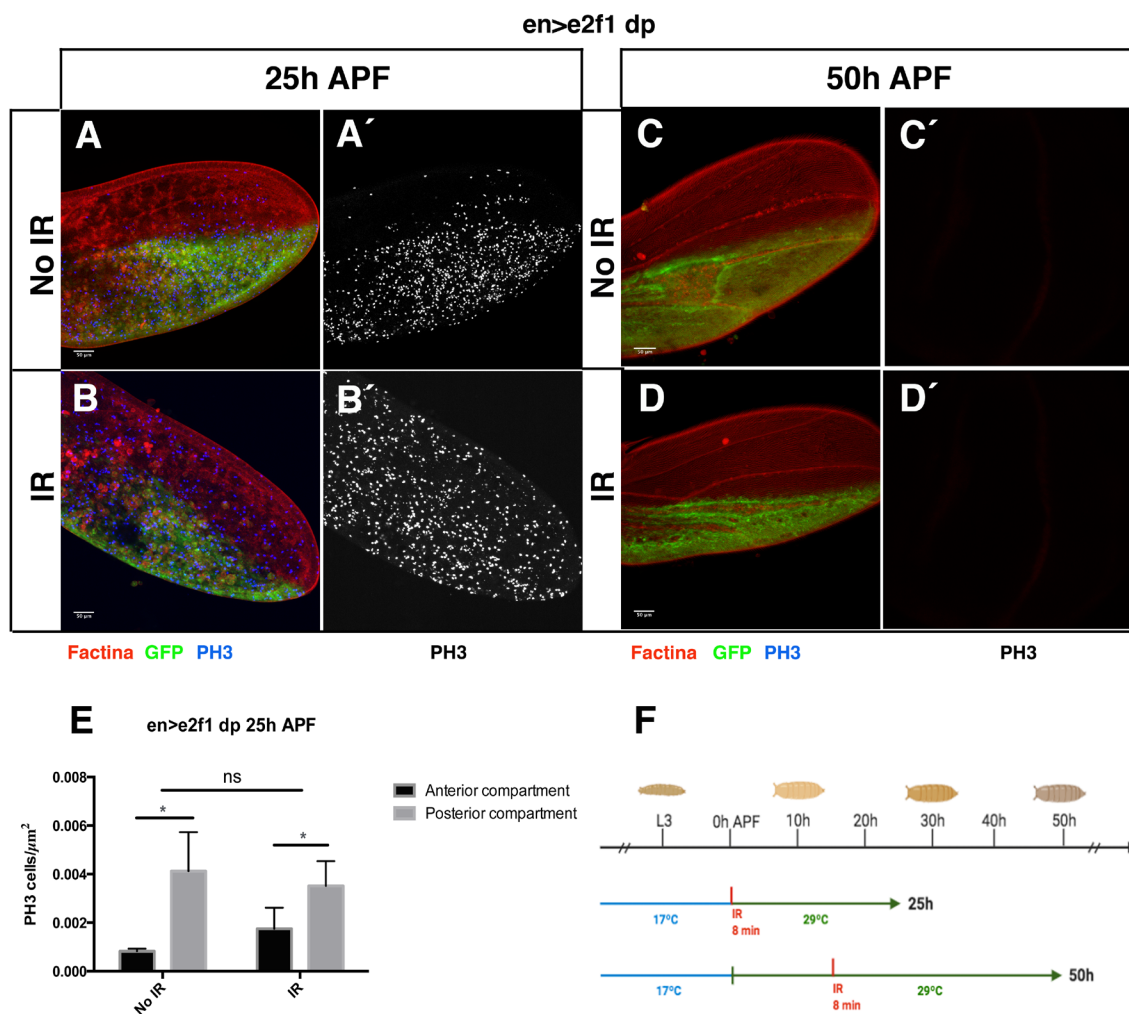


Figura R22. Respuesta proliferativa en el disco de ala ante la irradiación con rayos X y la sobre-expresión de *e2f1 dp* DFP. (A-D') Respuesta proliferativa a la irradiación y sobre-expresión de *e2f1 dp* de discos de ala DFP. Los discos de ala de pupa *en-Gal4 UAS-GFP UAS-e2f1 UAS-dp* fueron teñidos con el anticuerpo anti-PH3 (en azul en A-D , y en gris en A'-D') y Faloidina (en rojo en A-D). (E) Cuantificación del índice mitótico de discos de 25 h DFP sometidos a la sobre-expresión de *e2f1 dp* e irradiados a distintos tiempos DFP. (F) Representación del protocolo de sobre-expresión de *e2f1 dp* e irradiación. Se seleccionaron pupas de 0 h DFP y se cambiaron a 29°C (en verde) para inducir la sobre-expresión de *e2f1 dp* bajo el control de *en-Gal4* que dirige su expresión al compartimento posterior. A continuación se irradiaron las pupas durante 8 minutos y 16 segundos (4000R) a dos tiempos diferentes, 0 h y 25 h, y se diseccionaron discos de ala 25 h más tarde, a las 25 h y a las 50 h respectivamente, para analizar la respuesta proliferativa. (A-A') Discos de ala controles *en-Gal4 UAS-GFP UAS-e2f1 UAS-dp* sin irradiar de 25 h DFP y (C-C') 50 h DFP. (B-B') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-e2f1 UAS-dp* irradiados de 25 h DFP y (D-D') 50 h DFP. Nótese que la activación ectópica de *UAS-e2f1 UAS-dp* en el compartimento posterior induce proliferación celular de forma autónoma y no autónoma en las células de los discos controles no irradiados de 25 h DFP pero no en los de 50 h DFP. La irradiación es capaz de inducir la activación de la división celular en los discos de ala sometidos a la sobre-expresión de *UAS-e2f1 UAS-dp* a las 25 h pero no a las 50 h DFP. Las barras de error representan errores estándar (* p-valor<0,05, ns no significativo).

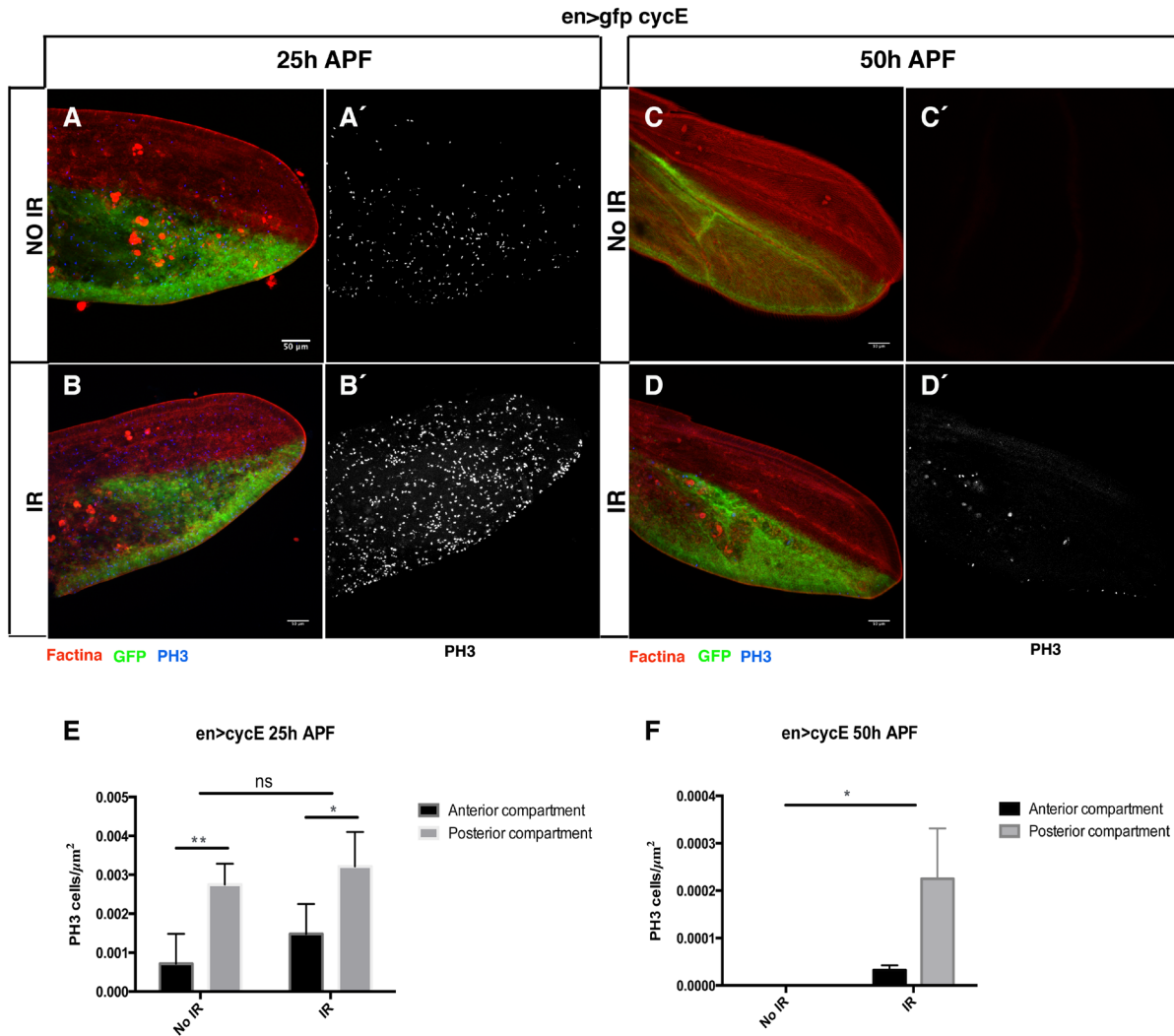


Figura R23. Respuesta proliferativa en el disco de ala ante la irradiación con rayos X y la sobre-expresión de *cycE* (A-D') Respuesta proliferativa a la irradiación y sobre-expresión de *cycE* de discos de ala DFP. Los discos de ala de pupa *en-Gal4 UAS-GFP UAS-cycE* fueron teñidos con el anticuerpo anti-PH3 (en azul en A-D, y en gris en A'-D') y Faloidina (en rojo en A-D). (E) Cuantificación del índice mitótico de discos de 25 y 50 h DFP sometidos a la sobre-expresión de *UAS-cycE* e irradiados a distintos tiempos DFP. (F) Representación del protocolo de sobre-expresión de *UAS-cycE* e irradiación. Se seleccionaron pupas de 0 h DFP y se cambiaron a 29°C (en verde) para inducir la sobre-expresión de *UAS-cycE* bajo el control de *en-Gal4* que dirige su expresión al compartimento posterior. A continuación se irradiaron las pupas durante 8 minutos y 16 segundos (4000R) a dos tiempos diferentes, 0 h y 25 h, y se diseccionaron discos de ala 25 h más tarde, a las 25 h y a las 50 h respectivamente, para analizar la respuesta proliferativa. (A-A') Discos de ala controles *en-Gal4 UAS-GFP UAS-cycE* sin irradiar de 25 h DFP y (C-C') 50 h DFP. (B-B') Discos de ala *en-Gal4 UAS-GFP UAS-cycE* irradiados de 25 h DFP y (D-D') 50 h DFP. Nótese que la activación ectópica de *UAS-cycE* en el compartimento posterior induce proliferación celular de forma autónoma y no autónoma en las células de los discos controles no irradiados de 25 h DFP pero no en los de 50 h DFP. La irradiación es capaz de inducir la activación de la división celular en los discos de ala sometidos a la sobre-expresión de *UAS-cycE* tanto a las 25 h pero como a las 50 h DFP. Las barras de error representan errores estándar (* p-valor<0,05, ns no significativo).

	20 h APF	30 h APF	35-40 h APF
Development	✓ ✓	X	X
Damage	✓ ✓ ✓	✓ ✓	X
CycE or E2f1 Dp.D	✓ ✓	X	X
CycE +E2f1 Dp.D+Stg	✓ ✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓
Damage and E2f1 DpD	✓ ✓ ✓	✓ ✓	X
Damage and CycE	✓ ✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓

Figura R24. Efecto de la sobre-expresión de distintos reguladores del ciclo celular y/o la inducción de daño en el comportamiento proliferativo de las células del disco de ala DFP. El símbolo ✓ indica presencia de proliferación celular, mientras que el símbolo X representa ausencia de células en división.

2.3. Caracterización del patrón de activación de JNK tras la inducción de apoptosis en los discos imaginales de ala de pupa

El inicio de la respuesta proliferativa inducida por apoptosis en estadios larvarios se debe a la activación de diferentes rutas de señalización, entre ellas la ruta de la JNK, que es considerada una de las señales iniciales. Para examinar la evolución de la actividad de esta ruta en respuesta al daño tras la metamorfosis, analizamos la expresión del reportero *TRE-GFP* tras la sobre-expresión de *rpr* bajo el control de *hh-Gal4* a distintos tiempos DFP. Seleccionamos pupas de 0 h DFP y las mantuvimos a 17°C hasta el equivalente a 10-15 h DFP a 25°C. Posteriormente, las pasamos a 29°C para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 25 h, 30 h y 35 h DFP a 25°C, momento en el que las diseccionamos para analizar la expresión del reportero *TRE-GFP* en el disco de ala. A diferencia de los experimentos de ablación genética anteriormente mencionados en los que analizamos la respuesta proliferativa, en este caso redujimos el tiempo de sobreexpresión de *rpr* para evitar la muerte celular masiva en el compartimento posterior, e impedir así que se perdiera parte del disco imaginal de ala. Observamos que en los discos de 25 h y 30 h DFP sometidos a la sobre-expresión de *rpr*, *TRE-GFP* se expresa principalmente en la región dañada, comparados con los controles en los que la expresión se restringe únicamente a los hemocitos de las venas (Fig. R25 A, B, C y D). Curiosamente, la expresión del reportero *TRE-GFP* se mantiene en la región dañada de los discos de 35 h DFP, a pesar de que a esta edad ya no se activa la proliferación celular (Fig. R25 E y F).

Resultados

Estos resultados indican que la inducción de apoptosis antes de las 24 h DFP da lugar a la activación de JNK tanto en los discos de pupa tempranos en los que se activa la respuesta proliferativa, como en los discos de pupa tardíos en los que no se activa la división celular en respuesta a la apoptosis.

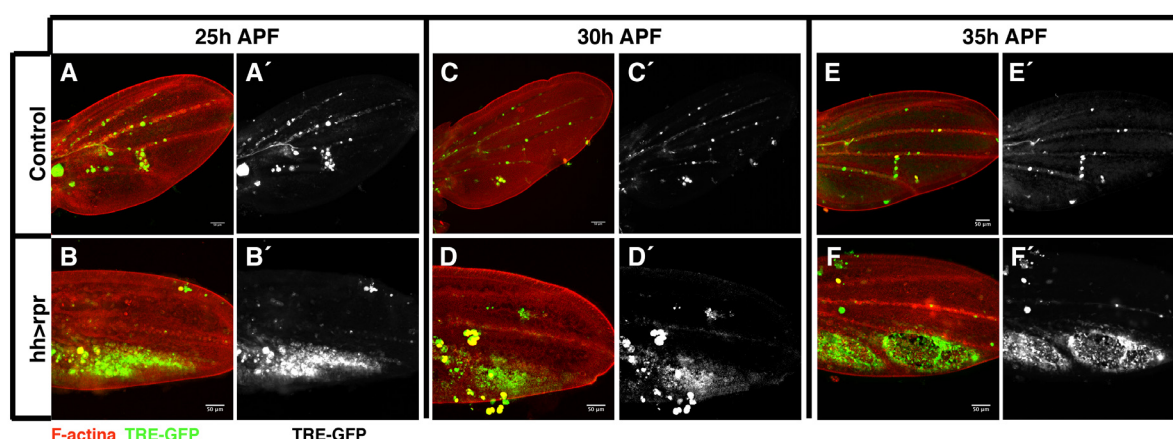


Figura R25. Patrón de activación de JNK tras la ablación genética del compartimento posterior en el disco de ala DFP. (A-F') Patrón de activación de JNK tras la ablación genética de discos de ala a distintas horas DFP. Los discos de ala de pupa *UAS-rpr hh-Gal4 tub-Gal80^{TS} TRE-GFP* fueron teñidos con Faloidina (en rojo en A-F). (A-B') Discos de ala controles de 25 h DFP, (C-D') 30 h DFP y (E-F') 35 h DFP. (B-B') Discos de ala sometidos a la inducción de apoptosis de 25h DFP, (D-D') 30 h DFP y (F-F') 35 h DFP. Se seleccionaron pupas de 0 h DFP y se mantuvieron a 17°C hasta el equivalente a 10-15 h DFP a 25°C. Posteriormente, se pasaron a 29°C para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 25 h, 30 h y 35 h DFP a 25°C, momento en el que se diseccionaron para analizar la expresión del reportero *TRE-GFP* en el disco de ala. Nótese que mientras en los discos controles la expresión del reportero de la ruta JNK se restringe a los hemocitos, en los discos sometidos a ablación genética el reportero de la ruta JNK se expresa en las células apoptóticas del compartimento posterior.

Nuestros datos indican que la inducción de apoptosis durante el período pupal temprano (10-15 h) induce la activación de la ruta JNK tanto en los discos en los que se observa una respuesta proliferativa tras un daño (25 h DFP), como en los discos de 35 h DFP en los que no se observa proliferación celular. A continuación analizamos si la sobre-expresión de *rpr* en las células post-mitóticas del disco de ala a partir de las 24 h DFP inducía la activación de la ruta JNK. Con ese fin, seleccionamos pupas de 0 h DFP y las mantuvimos a 17°C hasta el equivalente a 24 h DFP a 25°C. Posteriormente, las transferimos a 29°C para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 30 h DFP a 25°C, momento en el que las diseccionamos para analizar la expresión del reportero *TRE-RFP* y del marcaje anti-PH3. Encontramos que en estos discos la expresión de *TRE-RFP* aumenta en la región dañada respecto al control, al igual que habíamos observado en los discos de 30 h DFP sometidos a la sobre-expresión de *rpr* antes de las 24 h

DFP (Fig. R26).

Este resultado indica que la inducción de apoptosis en células post-mitóticas del disco imaginal de ala da lugar a la activación de JNK en la región dañada, pero no es capaz de promover la división celular.

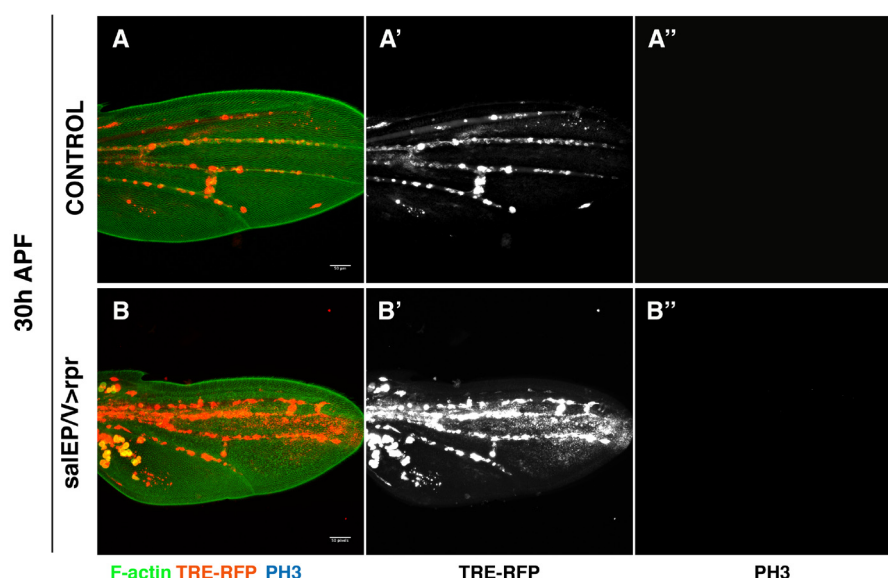


Figura R26. Activación de JNK tras la ablación genética del dominio Sal después de la salida del ciclo celular en el disco de ala DFP₊ (A-B'') Patrón de activación de JNK y respuesta proliferativa tras la ablación genética de discos de ala a las 25 h DFP. Los discos de ala de pupa *sal^{EP/V}-LHG lexO-rpr tub-Gal80^{ts} TRE-RFP* fueron teñidos con el anticuerpo anti-PH3 (en azul en A-B y en gris en A''-B'') y Faloidina (en verde en A). (A-A'') Disco de ala control de 30 h DFP. (B-B'') Disco de ala sometidos a la inducción de apoptosis de 30 h DFP. Se seleccionaron pupas de 0 h DFP y se mantuvieron a 17°C hasta el equivalente a 24 h DFP a 25°C. Posteriormente, se pasaron a 29°C para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 30 h DFP a 25°C, momento en el que se diseccionaron para analizar la expresión del reportero *TRE-RFP* y la división celular en el disco de ala. Nótese que en el disco control la expresión del reportero de la ruta JNK se restringe a los hemocitos. En el disco sometido a ablación genética la expresión del reportero se produce en las células del dominio Sal sometidas a la inducción de apoptosis, pero no se observa proliferación celular.

2.4. Requerimiento funcional de la ruta JNK durante la proliferación celular inducida por apoptosis en los discos de ala de pupa tempranos

Para investigar los requerimientos de la ruta de la JNK en respuesta al daño en estadios pupales, estudiamos el fenotipo que provoca la reducción de la función de esta ruta al mismo tiempo que inducimos muerte celular. Para ello utilizamos un mutante del ligando de la vía, Eiger, y sobre-expresamos *rpr* bajo el control de *sal^{EP/V}-LHG*. Seleccionamos pupas de 0 h DFP y las

Resultados

mantuvimos a 17°C hasta el equivalente a 12-13 h DFP a 25°C. Posteriormente, las pasamos a 29°C para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 34-35 h DFP a 25°C, momento en el que las diseccionamos para analizar el fenotipo del tamaño del disco de ala. Observamos que en los discos mutantes *eiger*^{1/3} de 35 h DFP en los que sobre-expresamos *rpr* se produce una fuerte reducción del tamaño del disco comparados con los discos controles *sal*^{EP/V}>*rpr* de 35 h DFP (Fig. R27).

Estos resultados sugieren que la ruta JNK sería necesaria durante el desarrollo pupal para activar la proliferación celular en respuesta a la apoptosis.

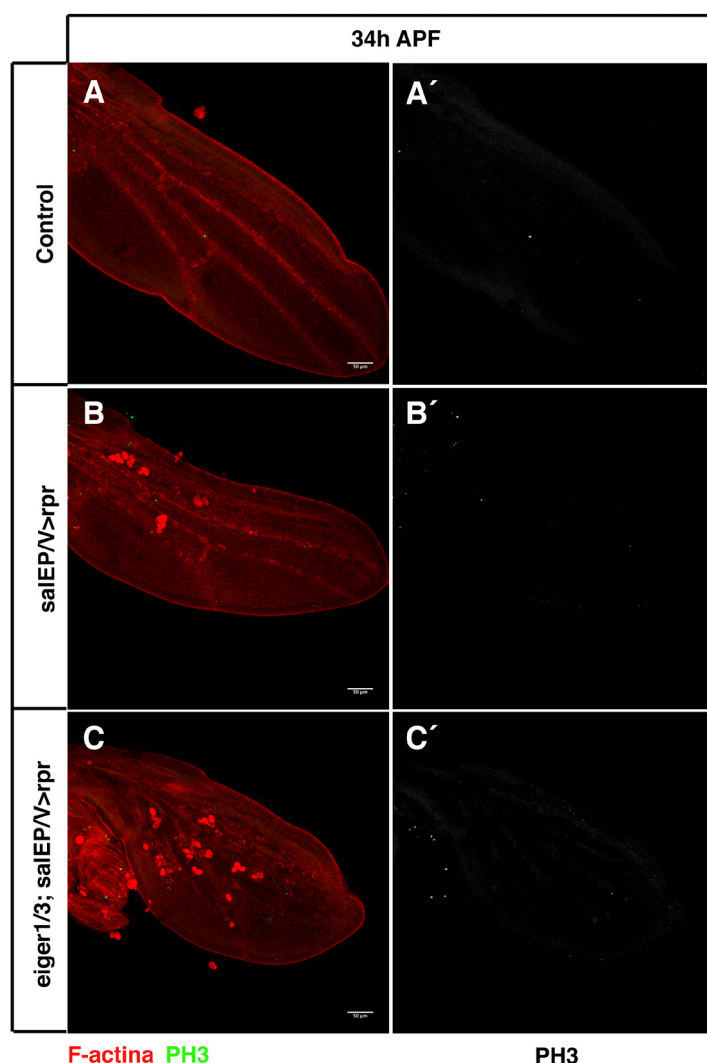


Figura R27. La ruta JNK es necesaria durante los primeros estadios del desarrollo pupal para activar la proliferación celular en respuesta a la apoptosis. Los discos de ala de pupa fueron teñidos con el anticuerpo anti-PH3 (en verde en A-C y en gris en A'-C') y Faloidina (en rojo en A-C). (A-A') Disco de ala control de 34 h DFP. (B-B') Disco de ala *sal*^{EP/V}-*LHG lexO-rpr tub-Gal80^{ts}* sometidos a la inducción de apoptosis de 34 h DFP. (C-C') Disco de ala mutantes para el ligando de la ruta JNK *eiger*^{1/3} *sal*^{EP/V}-*LHG lexO-rpr tub-Gal80^{ts}* sometidos a la inducción de apoptosis de 34 h DFP. Se seleccionaron pupas de 0h DFP y se mantuvieron a 17°C hasta el equivalente a 12-13 h DFP a 25°C. Posteriormente, se pasaron a 29°C para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 34-35 h DFP a 25°C, momento en el que se diseccionaron para analizar el tamaño del disco de ala y la división celular en el disco de ala. Nótese que en los discos mutantes *eiger*^{1/3} de 35 h DFP sometidos a la sobre-expresión de *rpr* se produce una fuerte reducción del tamaño del disco comparados con los discos controles *sal*^{EP/V}>*rpr*.

Para analizar si la activación de la ruta de la JNK es suficiente para inducir proliferación compensatoria en estadios pupales, activamos ectópicamente la ruta y analizamos la división celular. Para activar la ruta JNK sobre-expresamos *UAS-hep^{CA}* bajo el control de *en-Gal4*. Seleccionamos pupas de 0 h DFP y las mantuvimos a 17°C hasta el equivalente a 0 h y 15 h DFP a 25°C. Posteriormente, las pasamos a 29°C para activar la expresión ectópica de *rpr* hasta el equivalente a 25 h y 35 h DFP a 25°C, momento en el que las diseccionamos. Encontramos que en discos analizados a 25 h DFP se produce un incremento del índice mitótico respecto a los discos que sobre-expresan *rpr* (comparar Fig. R17 D' y J con Fig. R28). Curiosamente, este efecto también se observa en los discos analizados a las 35 h DFP. La proliferación celular inducida por la activación ectópica de la ruta JNK es mayor en los discos de 25 h DFP que en los de 35 h DFP, no existiendo diferencias significativas entre el compartimento anterior y el posterior de los discos de la misma edad (Fig. R28). Estos resultados muestran que la activación ectópica de la ruta JNK antes de las 24 h DFP es capaz de inducir proliferación celular hasta las 35 h DFP.

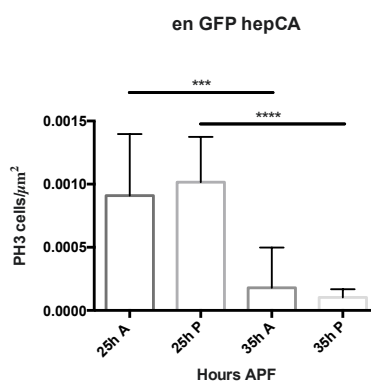


Figura R28. La activación ectópica de la ruta JNK induce proliferación celular en los discos de ala de pupa temprana pero no es suficiente a partir de las 24 h DFP para reactivar la división celular en el disco de ala. Las barras de error representan errores estándar (***) p-valor<0,005, **** p-valor<0,0005).

Con el objetivo de averiguar si la activación ectópica de la ruta JNK es capaz de estimular a las células post-mitóticas del disco de ala a re-entrar en el ciclo celular, seleccionamos pupas de 0 h DFP y las mantuvimos a 17°C hasta el equivalente de 24 h DFP. Posteriormente, las transferimos a 29°C hasta el equivalente de 30 h DFP. En esta condición experimental no observamos división celular. Estos resultados indican que la activación ectópica de la ruta JNK a partir de las 24 h DFP no es suficiente para reactivar la división celular. En conjunto, estos resultados sugieren que la ruta JNK se requiere en los discos de pupa tempranos para recuperar el tamaño del disco de ala tras la inducción de apoptosis, posiblemente mediante aumento de la proliferación celular inducida por apoptosis. Sin embargo, la activación de la ruta JNK tras la inducción de apoptosis en los discos de pupa tardíos a partir de las 24 h DFP no es suficiente para activar la división celular.

DISCUSIÓN

La plasticidad celular permite a los organismos multicelulares responder ante injerencias externas y mantener la homeóstasis de tejidos y órganos. Dos de las principales respuestas en los fenómenos de plasticidad celular son los cambios de especificación celular y la división celular. En este trabajo se han analizado estas dos respuestas en dos modelos diferentes. Por una parte, se ha caracterizado el papel de las rutas de señalización JNK y Jak/STAT en la pérdida de especificación celular empleando el disco imaginal de ala de tercer estadio larvario. Por otra parte, se ha definido hasta qué momento del desarrollo se mantiene la respuesta proliferativa de las células tras la inducción de apoptosis, utilizando el disco imaginal de ala durante el desarrollo pupal. Además, se ha identificado a CycE como posible factor limitante de la proliferación inducida por apoptosis DFP.

1. RE-ESPECIFICACIÓN CELULAR TRAS INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN LARVA

1.1. La ruta JAK/STAT media la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK.

La re-especificación celular es una de las principales respuestas durante la regeneración no sólo en órganos y tejidos que carecen de células madre sino también en los que las presentan (T. Sun et al., 2020, p. 2). Numerosos estudios han encontrado que la ruta JNK tiene un papel importante controlando, entre otros, el proceso de pérdida de especificación celular durante la regeneración (Mirsky et al., 2008). Esta ruta es una de las primeras vías de señalización que se activan tras la inducción de un daño y a su vez es responsable de la activación de diferentes vías de señalización, como JAK/STAT. Esta ampliamente descrito en la literatura científica la función de la ruta JAK/STAT en los procesos inflamatorios, el mantenimiento de las células madre, la proliferación y la supervivencia celular (Arbouzova & Zeidler, 2006; Herrera & Bach, 2019). Además, estudios recientes han mostrado también un papel de la ruta JAK/STAT como promotor de la re-especificación celular tras la inducción de un daño (Worley et al., 2018) y durante el desarrollo (Sheng et al., 2009). Sin embargo, se desconoce cuál es la relación funcional entre ambas rutas, JAK/STAT y JNK, en la inducción de la pérdida de especificación celular. Durante el desarrollo de esta tesis hemos definido una función de la ruta JAK/STAT como mediador en la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular inducida por la activación de la ruta JNK.

Nuestros resultados muestran que la activación ectópica de la ruta JNK induce la pérdida de

marcadores de especificación celular tanto de forma autónoma como no autónoma en las células colindantes. Por el contrario, la activación ectópica de la ruta JAK/STAT no causa ningún efecto en la especificación celular. No obstante, la inhibición de la ruta JAK/STAT al mismo tiempo que se activa ectópicamente la ruta JNK suprime parcialmente la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular, mientras que la activación ectópica de ambas rutas, JNK y JAK/STAT, incrementa este efecto. Igualmente, en un estudio reciente muestran que la activación ectópica de las rutas JNK y JAK/STAT en la región presuntiva del ala da lugar a un aumento significativo de la frecuencia de formación de alas ectópicas en la región del tórax del disco imaginal de ala, mientras que la eliminación de una copia del factor de transcripción STAT92E al mismo tiempo que se activa la ruta JNK disminuye significativamente la frecuencia de aparición de alas ectópicas en la región del tórax (Worley et al., 2018). En ambos casos, las rutas JNK y JAK/STAT tienen una función como promotores de plasticidad celular.

Estos resultados sugieren que la activación ectópica de la ruta JNK induce la secreción de una señal difusible encargada de mediar la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular en las células próximas, y que la generación de esta señal es parcialmente dependiente, entre otras, de la actividad de la ruta JAK/STAT. Este modelo está apoyado por el hecho de que la expresión de los reporteros de la ruta JNK analizados se restringe principalmente al compartimento en el que se activa ectópicamente esta vía de señalización. El hecho de que la activación ectópica de la ruta JAK/STAT por sí sola no cause ningún cambio en la especificación celular indica que JAK/STAT no es el único mecanismo a través del cual la ruta JNK induce la pérdida de marcadores de especificación celular.

En conjunto, estos datos son compatibles con un modelo en el que el control de la expresión génica de cierta o ciertas señales difusibles implicadas en la pérdida de especificación celular no autónoma estaría mediado por elementos de regulación en cis compuestos por sitios de unión para factores de transcripción de repuesta a JNK y para el complejo de factores de transcripción de repuesta a JNK y STAT (Fig. D1).

Una posibilidad es que tras la activación de JNK, los factores de transcripción Fos y Jun se unan a las regiones reguladoras para AP-1 en el gen que codifica para la señal difusible promoviendo su expresión. AP-1 es un complejo formado por las familias de proteínas Fos y Jun, que funcionan como factores de transcripción diméricos uniéndose a los elementos reguladores AP-1 en las regiones promotoras y los enhancers de los genes diana de la ruta JNK. Un estudio con cultivos de células humanas ha demostrado que los factores de transcripción AP-1 interactúan con los factores de transcripción STAT en el control de la activación del gen NOS2. Además en este estudio encuentran que únicamente el factor de transcripción c-Fos, pero no el factor de

transcripción Jun, es capaz de interaccionar físicamente con STAT-1 tras la activación de las células con interferón gamma (Xu et al., 2003). La activación de la ruta JNK induciría, entre otras, la activación de la ruta JAK/STAT, lo que daría lugar a la formación del heterodímero Fos-STAT, que se uniría también a la región reguladora del gen que codifica para la señal implicada en la pérdida de especificación celular, aumentando aún más su transcripción. En este modelo, la interacción de los factores de transcripción Fos con STAT facilitaría la unión de STAT a sus sitios de unión en el ADN, dando lugar a una unión más firme. La inhibición de la ruta JAK/STAT a la vez que se activa la ruta JNK impediría que se formasen los heterodímeros Fos-STAT pero no los complejos AP-1, por lo que la activación de la transcripción se mantendría aunque a niveles más bajos. La activación exclusiva de la ruta JAK/STAT no tendría ningún efecto en la transcripción del gen que codifica para la señal implicada en la pérdida de especificación celular debido a que los heterodímeros Fos-STAT no se podrían formar y la unión de los factores de transcripción STAT al ADN no se vería facilitada por las proteínas Fos.

Otra posibilidad es que los factores que regulan la transcripción de la señal difusible en respuesta a la activación de la ruta JNK no sean AP-1 sino otros activados por Dronc, que se comportarían de igual modo.

Una vez sintetizada y secretada de la célula, esta señal difusible promovería la re-especificación celular de las células colindantes mediante la regulación de proteínas del complejo Polycomb y/o Trithorax.

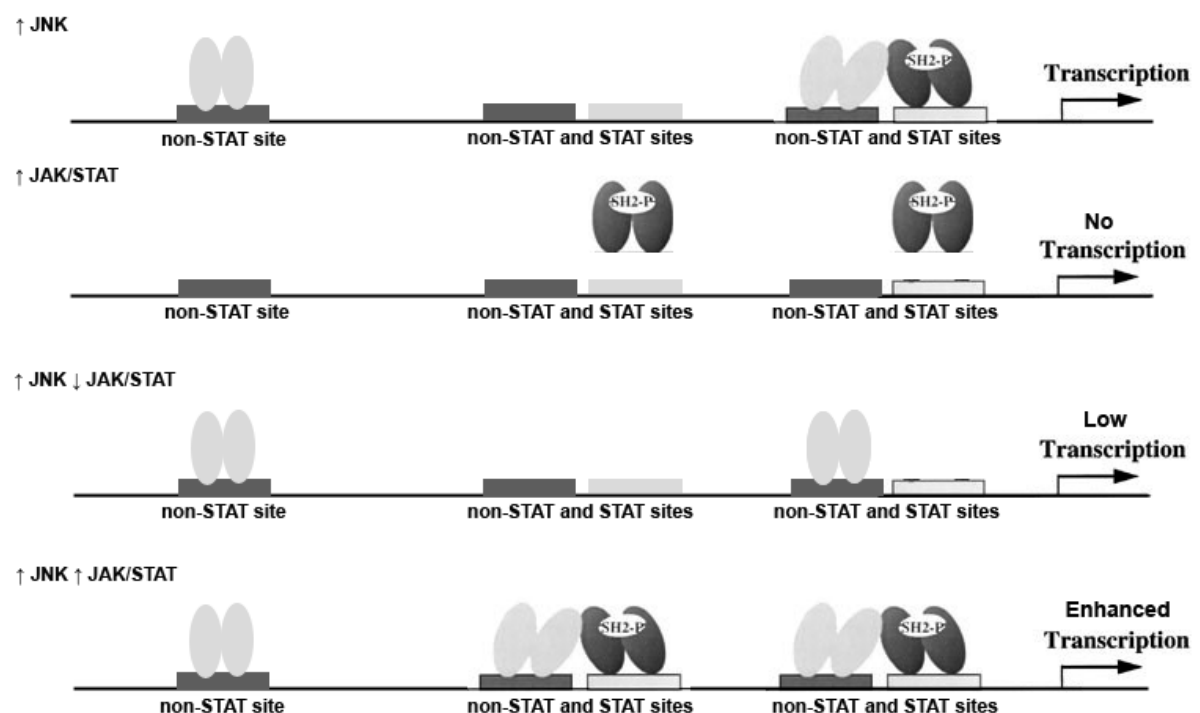


Figura D1. Modelo de posible mecanismo de activación transcripcional de la señal implicada en la pérdida de especificación celular por los factores de transcripción STAT y de respuesta a JNK. Ambos factores de transcripción serían necesarios para activar la expresión del gen o los genes que codificarían para la/s señal/es difusible/s implicada/s en la pérdida de especificación celular. Además, la interacción de los factores de transcripción de respuesta a JNK con STAT facilitaría la unión de STAT a sus sitios de unión en el ADN. Los factores de transcripción de respuesta a JNK podrían ser dianas de Dronc. Basado en (Shuai, 2000; Xu et al., 2003)

La activación ectópica de la ruta JNK induce la represión de la expresión de los genes del complejo Polycomb (Lee et al., 2005). Se han descrito funciones de estos complejos como inductores de modificaciones epigenéticas en la estructura de la cromatina que la convierten en una conformación cerrada. Esta conformación dificulta el acceso de la maquinaria de transcripción al ADN, impidiendo la expresión de los genes. Varios estudios han mostrado que los complejos Polycomb tienen un papel promoviendo la plasticidad celular (Sparmann & van Lohuizen, 2006). De acuerdo con estos estudios previos, es posible que la pérdida autónoma de marcadores de especificidad celular inducida por la activación ectópica de la ruta JNK podría estar mediada por la represión de la expresión de los genes del complejo Polycomb.

1.2. La pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular inducida por JNK es parcialmente independiente de su función apoptótica, pero dependiente de Dronc.

Una de las principales funciones de la ruta JNK es la activación de la apoptosis. Nuestros resultados muestran, por un lado, que la inhibición de la apoptosis a nivel de los genes pro-apoptóticos *rpr*, *hid* y *grim* a la vez que se activa ectópicamente la ruta JNK no suprime por completo la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular. De hecho, la inducción de apoptosis a nivel de los genes pro-apoptóticos en nuestras mismas condiciones experimentales no es capaz de reproducir la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular observada tras la activación ectópica de la ruta JNK. Para conseguir reproducir este efecto es necesario duplicar el tiempo de activación ectópica de la apoptosis. Este resultado sugiere que la sobre-expresión del gen pro-apoptótico *rpr* induciría la generación de la señal difusible encargada de la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular indirectamente a través de la activación de la ruta JNK.

Por otro lado, encontramos que la eliminación de la caspasa iniciadora Dronc suprime por completo la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular tras la activación ectópica de la ruta JNK.

En conjunto, estos datos sugieren que la generación de la señal difusible encargada de inducir la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular tras la activación ectópica de la ruta JNK es parcialmente independiente de la función de JNK como promotor de la apoptosis, pero dependiente de la actividad de Dronc. Esta función de Dronc iría en la línea de numerosos estudios que han descrito funciones de Dronc independientes de la apoptosis (Kumar, 2004). El hecho de que Dronc sea necesario para inducir la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular tras la activación ectópica de la ruta JNK podría explicar por qué la inhibición de la apoptosis a nivel de los genes pro-apoptóticos a la vez que se activa ectópicamente la ruta JNK no suprime por completo este efecto.

1.3. La re-especificación celular inducida por la ruta JNK es independiente de la señalización por Dpp durante el desarrollo.

Dpp tiene una función fundamental en el desarrollo del patrón del ala, otorgando a las células del disco imaginal información posicional respecto al borde A/P. Sin embargo, nuestras observaciones indican que la pérdida no autónoma de marcadores de vena y provena tras la activación ectópica de la ruta JNK no se debe a cambios en la señalización por Dpp. Así, la activación ectópica de la ruta JNK no modifica el dominio ni los niveles de expresión de pMad y Spalt mayor, proteínas codificadas por genes diana de la ruta Dpp. Además, nuestros resultados muestran que la activación ectópica de la ruta JNK en discos mutantes para Dronc suprime por completo la pérdida de marcadores de especificidad celular, a pesar de que se ha encontrado que en estas condiciones se induce la activación ectópica de Dpp y Wg (Pérez-Garijo et al., 2009). Por lo tanto, consideramos que la pérdida de especificidad celular causada por la activación ectópica de la ruta JNK en el disco de ala es una respuesta homeostática y regenerativa del tejido dependiente de Dronc, y no un efecto colateral de la modificación en el programa normal de desarrollo inducido por factores implicados en la especificación del patrón como el morfógeno Dpp.

2. PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR APOPTOSIS EN PUPA

2.1. La inducción de apoptosis antes de las 24h DFP induce proliferación celular hasta las 30 h DFP.

La proliferación inducida por apoptosis ha sido ampliamente estudiada empleando como

modelo discos imaginales de tercer estadio larvario, lo cual ha contribuido al conocimiento de los mecanismos genéticos y moleculares que la regulan. Además, numerosos estudios realizados en discos imaginales de tercer estadio larvario han mostrado que la proliferación celular es una de las principales respuestas durante la regeneración de un tejido. Aunque se ha establecido el final de la capacidad regenerativa de los discos imaginales al final del tercer estadio larvario, un estudio ha mostrado que la respuesta proliferativa tras un daño en discos larvarios se mantiene hasta las 38 h DFP (Wells & Johnston, 2012). Sin embargo, no se conoce si las células de los discos imaginales pueden ser estimuladas a entrar en división tras la inducción de un daño DFP ni hasta qué momento. Durante el desarrollo de esta tesis hemos comprobado que la inducción de un daño en discos de ala DFP produce una respuesta proliferativa que se mantiene hasta las 30 h DFP.

Estudios previos han mostrado que la sobre-expresión en estadios pupales de un regulador clave de la transición G1-S como son *CycE*, *CycE/Cdk2*, *CycD/Cdk4* o *E2F* mantiene la división celular hasta las 30 h DFP. Sin embargo, la sobre-expresión de *cycE*, *cycD* o *e2f* a partir de las 28 h DFP, es decir después de que se haya producido la salida de las células del ciclo celular, no es capaz de activar la proliferación celular en el disco de ala. Es necesaria la activación ectópica de ambos reguladores del ciclo *cycE* y *e2f* para mantener a las células proliferando hasta, al menos, las 40-44 h DFP. Estos datos indican que el mecanismo de retroalimentación positiva que existe en estadios larvarios entre *CycE* y *E2F* deja de funcionar a partir 30 h DFP. Nuestros resultados muestran que la inducción de apoptosis en discos imaginales de ala antes de las 24 h DFP, es decir, antes de que las células abandonen el ciclo celular durante el desarrollo normal, induce proliferación celular hasta las 30 h DFP. El hecho de que el final de la respuesta proliferativa a la apoptosis (30 h DFP) coincida con el final de la retroalimentación positiva entre *CycE* y *E2F* (30 h DFP) sugiere que las señales mitogénicas producidas por las células apoptóticas actuarían a nivel de *CycE* o *E2F* promoviendo la división celular hasta las 30 h DFP, pero a partir de las 30 h DFP sería necesario activar simultáneamente la apoptosis y *cycE* o la apoptosis y *e2F* para inducir proliferación celular.

El final de la retroalimentación positiva entre *CycE* y *E2F* y el final de la respuesta proliferativa tras un daño coinciden aproximadamente con el inicio del cierre epigenético de regiones reguladoras de genes clave en el control del ciclo celular como *cycE*, *e2f1* y *string*. Un estudio reciente ha demostrado que factores de transcripción de respuesta a la Ecdisona controlan los cambios temporales en la accesibilidad de la cromatina que se producen a lo largo del desarrollo del disco de ala (Uyehara et al., 2017). Concretamente, el factor de transcripción *E93* se expresa a las 18 h y 24 h DFP y la proteína se detecta tanto en discos de 24 h como de 44 h DFP. La mutación del gen *e93* da lugar no sólo a la pérdida de la accesibilidad en varias regiones del

genoma, sino también a la presencia aberrante de numerosas regiones de cromatina abierta en discos de ala de 24 y 44 h DFP. Puesto que esta ventana temporal coincide con el momento en el que se produce el cierre epigenético de las regiones reguladoras de los genes *cycE*, *e2f1* y *string*, es posible que el factor de transcripción E93 sea el responsable del cierre de la cromatina en las regiones reguladoras de estos genes en las células del disco de ala de pupa tardía. De hecho, datos de este estudio muestran que en discos de ala mutantes para *e93* se recupera la accesibilidad de la cromatina asociada a regiones reguladoras de los genes que codifican para la CycE y String 44 h DFP (Fig. D2). Por lo tanto, el último pico de la hormona Ecdisona durante el desarrollo pupal activa a E93, que a su vez induciría la salida irreversible de las células del disco de ala del ciclo celular mediante el cierre epigenético de regiones reguladoras de genes clave en el control del ciclo celular como *cycE*, *e2f1* y *string*. Esta hipótesis es compatible con resultados recientes encontrados en estudios con ratón en los que se muestra que el incremento de hasta 50 veces en los niveles de las hormonas tiroideas justo después del nacimiento coincide con la salida de los cardiomiocitos del ciclo celular. Además, la inhibición de las hormonas tiroideas durante este período rescata la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos que han abandonado el ciclo celular (Hirose et al., 2019). En ambos casos la señalización hormonal controlaría la salida de las células del ciclo celular.

Como hemos descrito, el daño retrasa pero no evita la salida de las células del ciclo celular. Probablemente, la incapacidad de prolongar la respuesta proliferativa tras un daño en discos de pupa más allá de las 30 h DFP se deba a la imposibilidad de inducir un retraso significativo en el desarrollo. De manera que cuando el último pico de Ecdisona activa al factor de transcripción E93, se induciría el cierre epigenético de regiones reguladoras de genes clave en el control del ciclo celular impidiendo que continúe la respuesta proliferativa al daño. Numerosos estudios han mostrado que el daño en discos de tercer estadio larvario temprano activa la expresión de *dilp8*, péptido encargado de parar el desarrollo mediante la inhibición de la síntesis de la hormona Ecdisona, permitiendo así que haya tiempo para reparar el tejido (Gontijo & Garelli, 2018; Jaszczak & Halme, 2016). Sin embargo, el daño en discos de tercer estadio larvario tardío activa la expresión de *dilp8* a niveles significativamente más bajos (Harris et al., 2016). Teniendo en cuenta estos datos, es posible que los elevados niveles de la hormona Ecdisona que se producen al final del tercer estadio larvario y durante la metamorfosis inhiban directa o indirectamente la expresión de *dilp8* en discos dañados DFP. La imposibilidad de inducir un retraso significativo del desarrollo en respuesta a un daño en discos de ala DFP convertiría al cierre epigenético de las regiones reguladoras de genes clave en el control del ciclo celular, como *cycE*, *e2f1* y *string*, en el evento limitante de la respuesta proliferativa al daño. En este sentido sería conveniente comprobar si Dilp8 se expresa o no tras inducir un daño en discos de ala silvestres y mutantes para el receptor de la Ecdisona DFP. Y si la respuesta proliferativa tras

Discusión

la inducción de un daño DFP en discos mutantes para E93 se prolonga más allá de las 35-40 h DFP.

De acuerdo con este modelo, la imposibilidad de inducir un retraso significativo del desarrollo en respuesta a un daño en discos de ala DFP estaría provocado por los elevados niveles de la hormona Ecdisona e impediría no sólo que se mantuviera la respuesta proliferativa sino que se activaran el resto de respuestas regenerativas. Inhibir los elevados niveles de Ecdisona, especialmente el último pico de activación, que se producen durante la metamorfosis hasta unos niveles basales óptimos para la proliferación celular podría prolongar la respuesta proliferativa y posiblemente regenerativa de los discos tras un daño DFP. Este modelo es compatible con resultados encontrados en estudios regenerativos con urodelos, el pez cebra y ratón. En los urodelos, la hormona tiroidea está implicada en la inducción de la metamorfosis y se ha visto que Lin-28, proteína de unión al ARN que regula a Let-7, inhibe la expresión de los genes diana de la hormona tiroidea, retrasa el desarrollo y prolonga el potencial regenerativo tras un daño (Faunes et al., 2017). Igualmente, la inhibición de la señalización por las hormonas tiroideas a nivel de su síntesis y a nivel del receptor en ratones neonatos rescata la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos y el potencial regenerativo del corazón en adultos (Hirose et al., 2019). Y por el contrario, la administración exógena de hormonas tiroideas en el pez cebra inhibe la capacidad regenerativa del corazón y la aleta caudal (Hirose et al., 2019; L. Sun et al., 2019).

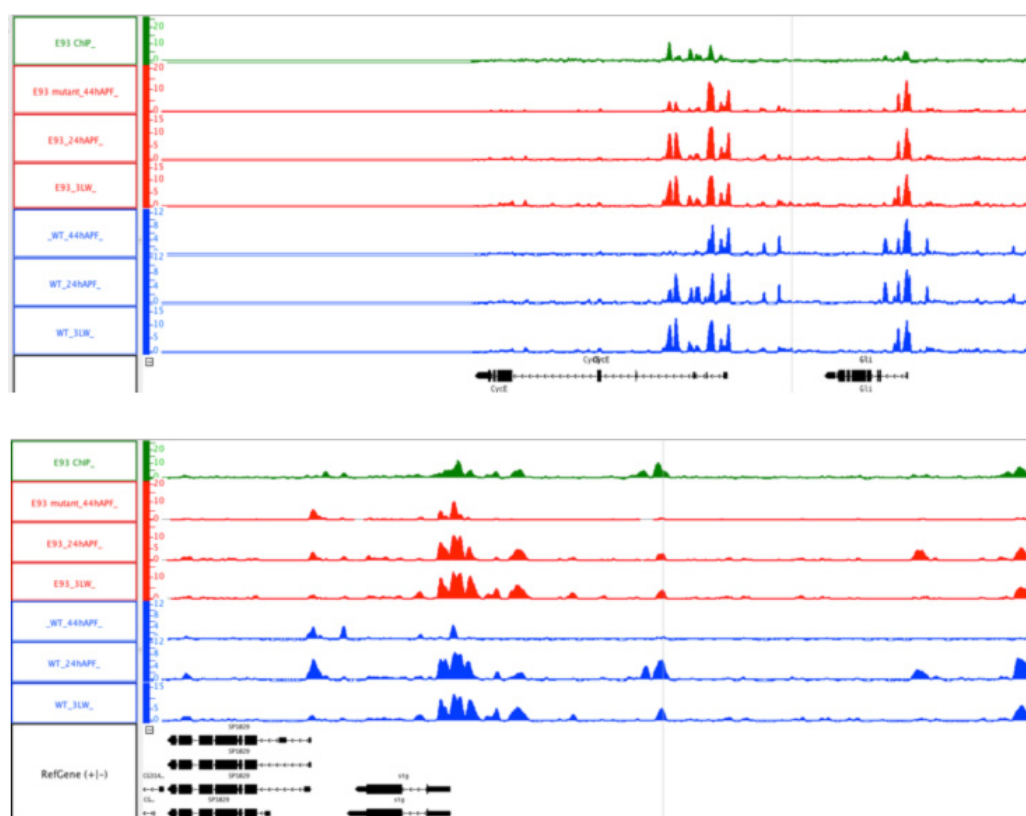


Figura D2. Diagramas de experimento de ChIPseq. Discos de ala a distintos tiempos, tercer estadio larvario, 24 h y 44 h DFP (APF), controles (azul) y mutantes para *e93* (rojo) en los que los picos muestran regiones genómicas de cromatina abierta correspondientes a posibles regiones reguladoras de los genes *cycE* y *string*. Nótese que mientras en los discos controles de 44 h DFP ciertas regiones de cromatina abierta se cierran comparados con los discos controles larvarios y de 24 h DFP, en los discos mutantes para *e93* se rescata parcialmente este cierre epigenético.

2.2. La inducción de apoptosis después de las 24h DFP no induce proliferación celular.

Nuestras observaciones indican que la inducción de apoptosis a partir de las 24 h DFP no induce proliferación celular en discos imaginales de ala de 30 h DFP. Estos resultados sugieren que la inducción de apoptosis a partir de las 24 h DFP no es capaz de inducir la re-entrada de las células en el ciclo celular. Como hemos mencionado la sobre-expresión de *cycE*, *cycD* o *e2f* a partir de las 28 h DFP no es capaz de activar la proliferación celular en el disco de ala. Es necesaria la activación ectópica de ambos reguladores del ciclo a la vez, *cycE* y *e2f* o *cycD* y *e2f*, para inducir división celular más allá de las 48 h DFP.

Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión individual de *rpr*, *e2f1 dp* o *cycE* en discos imaginales de ala a partir de las 26 h DFP, una vez que las células ya han abandonado el ciclo celular durante el desarrollo normal, no induce proliferación celular a las 46 h DFP. La co-expresión de *rpr* y *e2f1 dp* en discos de ala a partir de las 26 h DFP tampoco activa la proliferación celular a las 46 h DFP. Sin embargo, la co-expresión de *rpr* y *cycE* a partir de las 26 h DFP es capaz de inducir división celular hasta, al menos, las 46 h DFP. Estos datos son compatibles con un modelo en el que las señales mitogénicas producidas por las células apoptóticas activarían a E2F pero no a CycE. De esta manera, CycE sería el factor limitante para la activación de la proliferación inducida por apoptosis DFP.

Un estudio reciente ha encontrado mediante experimentos de FAIREseq que la accesibilidad del ADN en regiones reguladoras concretas de los genes *cycE*, *e2f1* y *string* cambia a medida que avanza el desarrollo pupal. La cromatina asociada a estos enhancers o regiones reguladoras presenta una conformación abierta hasta las 24 h DFP y posteriormente, entre las 36 h y 44 h DFP, se cierra. Este cierre epigenético coincide con el momento en el que hemos detectado que las células del disco de ala pierden la capacidad de activar la proliferación celular en respuesta a la activación ectópica de la apoptosis DFP. Nuestros resultados podrían explicarse bien porque las señales activadas en las células sometidas a la sobre-expresión de *rpr* inducen cambios en el estado de la cromatina asociada a las regiones reguladoras del gen *e2f1*, o bien porque existe un retraso en el desarrollo y por tanto un retardo en el cierre epigenético de las regiones reguladoras del gen *e2f1*. Si hubiera una parada significativa en el desarrollo, esperaríamos

observar un retraso y por lo tanto la proliferación celular continuaría hasta las 46 h DFP también en los casos de sobre-expresión de *rpr*, *e2f1 dp*, que es algo que no observamos. Por otro lado, la diferenciación de los tricomas presentes en las células del ala ocurre con normalidad en discos dañados en estadios pupales. Si existiera un retraso en el desarrollo, estos tricomas no aparecerían diferenciados. Todos estos resultados sugieren que si existe un retraso en el desarrollo de los discos como consecuencia de la sobre-expresión de *rpr*, éste es leve. En este sentido, sería conveniente comprobar si Dilp8 se expresa o no en el disco imaginal de ala en nuestras condiciones experimentales.

Así, consideramos que la hipótesis más factible es que ciertas señales activadas por las células sometidas a la sobre-expresión de *rpr* induzcan cambios en el estado de la cromatina asociada a las regiones reguladoras del gen *e2f1* permitiendo su expresión a las 46 h DFP.

2.3. Respuesta apoptótica tras la irradiación de los discos imaginales de ala DFP

La irradiación con rayos X de pupas tempranas de 0 h y 10 h DFP induce proliferación celular en los discos de ala observados 20 h más tarde, a las 20 h y 30 h DFP respectivamente. Sin embargo, la irradiación de pupas a las 20 h DFP, no activa la división celular en los discos de ala observados 20 h más tarde, a las 40 h DFP. Hemos detectado que las células de los discos de 40 h DFP irradiados a las 20 h DFP no se mueren. Numerosos estudios han mostrado que las células post-mitóticas no se mueren tras la inducción de un daño en el ADN mediante irradiación (Qi & Calvi, 2016; Zhang et al., 2014). Dado que las células del disco de ala abandonan el ciclo celular a las 24 h DFP, nuestros datos son compatibles con los resultados obtenidos en dichos trabajos previos. Sería conveniente comprobar si la irradiación de pupas de 20 h DFP es capaz de inducir apoptosis en los discos de ala 5 o 10 h más tarde, a las 25 h o 30 h DFP.

Nuestros resultados muestran que la irradiación, la sobre-expresión de *cycE* o la sobre-expresión de *e2f1* inducen división celular en el disco de ala a las 25 h DFP, pero no a las 50 h DFP. La irradiación y sobre-expresión de *e2f1* tampoco es capaz de inducir división celular en el disco de ala 50 h DFP. Sin embargo, la respuesta proliferativa de los discos sometidos a irradiación y a la sobre-expresión de *cycE* se mantiene hasta las 50 h DFP. A pesar de que la irradiación no induce muerte celular a esta edad, sí podría activar señales de respuesta al daño que junto con CycE promoverían la proliferación celular. Además, se ha descrito que tanto la sobre-expresión de *cycE* como la sobre-expresión de *e2f1* activan la apoptosis. Nuestros datos sugieren que en caso de que la sobre-expresión de *cycE* a las 50 h DFP activase estas señales apoptóticas, éstas no serían suficientes para activar la proliferación celular. Serían necesarias las señales

de respuesta al daño generadas por la irradiación para activar la división celular en discos sometidos a la sobre-expresión de *cycE*. Estas señales de respuesta al daño inducirían directa o indirectamente la activación de E2F. Dado que la retroalimentación entre CycE y E2F deja de funcionar a las 30 h DFP, únicamente la irradiación y la sobre-expresión de *cycE* activarían la proliferación celular.

2.4. Papel de la ruta JNK en la proliferación inducida por apoptosis en discos imaginales de ala DFP

La inducción de muerte en los discos de ala DFP induce la expresión del reportero de la ruta JNK tanto en estadios tempranos en los que observamos proliferación celular inducida por apoptosis, como en estadios tardíos en los que la sobre-expresión de *rpr* no es suficiente para estimular a las células a dividirse.

La inhibición de la ruta JNK a nivel del ligando Eiger en discos de ala sometidos a la sobre-expresión de *rpr* durante los estadios tempranos DFP da lugar a discos de ala de un tamaño más reducido que los controles. Esto puede ser debido a que JNK tiene un papel activando la proliferación celular en respuesta a la apoptosis durante los primeros estadios DFP.

La activación de la ruta JNK en las células apoptóticas del disco de ala de pupa tardía, cuando se ha perdido la capacidad proliferativa, indica que esta ruta JNK no es suficiente para activar la división celular a partir de las 36 h DFP. Se ha descrito en modelos de regeneración en discos larvarios que la ruta JNK actúa como inhibidor del grupo de proteínas Polycomb. Como hemos descrito la activación de la ruta JNK en los discos pupales no es suficiente para activar la división celular, lo que sugiere que la activación de esta ruta en estadios tardíos de desarrollo no es suficiente para revertir el silenciamiento epigenético de los reguladores del ciclo *cycE*, *e2f1* y *string*.

CONCLUSIONES

1. La activación ectópica de la ruta JNK en el disco de ala de tercer estadio larvario induce la pérdida de marcadores de especificación celular tanto de forma autónoma como no autónoma.
2. La ruta Jak/STAT no causa ningún efecto en la especificación de las células en el disco de ala de tercer estadio larvario.
3. La ruta Jak/STAT media la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular inducida por la ruta JNK.
4. La ruta JNK induce la pérdida no autónoma de marcadores de especificación celular de manera dependiente de Dronc, independiente de la señalización por Dpp y parcialmente independiente de su función apoptótica.
5. En células del disco imaginal de ala es posible inducir proliferación compensatoria mediante irradiación con rayos X o la activación ectópica de apoptosis hasta las 30 h DFP, siempre que sean sometidas a estos tratamientos antes de las 24h DFP ,
6. Ciclina E es el factor limitante de la respuesta proliferativa al daño en el disco de ala de pupa tardía.
7. Las células de los discos de 40 h DFP sometidos a irradiación con rayos X a las 20 h DFP no se mueren mediante apoptosis.
8. Las células del disco de ala tanto de 25 h DFP como 35 h DFP activan la ruta JNK tras la inducción de factores apoptóticos.
9. La activación de la ruta JNK tras la inducción de apoptosis no es suficiente para activar la división celular a partir de las 36 h DFP en el disco de ala.
10. La ruta JNK se requiere para la inducción de la respuesta proliferativa tras un daño en el disco de ala DFP.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2185-2195.
- Addison, W. R., Brook, W. J., Querengesser, L. D., Tiong, S. Y., & Russell, M. A. (1995). Analysis of an enhancer trap expressed in regenerating *Drosophila* imaginal discs. *Genome*, 38(4), 724-736.
- Adler, P. N., & MacQueen, M. (1984). Cell proliferation and DNA replication in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 103(1), 28-37.
- Aldaz, S., Escudero, L. M., & Freeman, M. (2010). Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14217-14222.
- Arbouzova, N. I., & Zeidler, M. P. (2006). JAK/STAT signalling in *Drosophila*: Insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development (Cambridge, England)*, 133(14), 2605-2616.
- Baena-Lopez, L. A., Franch-Marro, X., & Vincent, J.-P. (2009). Wingless promotes proliferative growth in a gradient-independent manner. *Science Signaling*, 2(91), ra60.
- Baguna, J., Salo, E., & Auladell, C. (1989). Regeneration and pattern formation in planarians. III. that neoblasts are totipotent stem cells and the cells. *Development*, 107(1), 77-86.
- Barrio, L., & Milán, M. (2020). Regulation of Anisotropic Tissue Growth by Two Orthogonal Signaling Centers. *Developmental Cell*, 52(5), 659-672.e3.
- Bate, M., & Arias, A. M. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 112(3), 755-761.
- Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M., Hoskins, R. A., & Spradling, A. C. (2004). The BDGP gene disruption project: Single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics*, 167(2), 761-781.

Bibliografía

- Bely, A. E., & Nyberg, K. G. (2010). Evolution of animal regeneration: Re-emergence of a field. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(3), 161-170.
- Bergantiños, C., Corominas, M., & Serras, F. (2010). Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development (Cambridge, England)*, 137(7), 1169-1179.
- Blair, S. S. (2007). Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 293-319.
- Boone, E., Colombani, J., Andersen, D. S., & Léopold, P. (2016). The Hippo signalling pathway coordinates organ growth and limits developmental variability by controlling *dilp8* expression. *Nature Communications*, 7, 13505.
- Bosch, M., Baguñà, J., & Serras, F. (2008). Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs. *The International Journal of Developmental Biology*, 52(8), 1043-1050.
- Bosch, M., Serras, F., Martín-Blanco, E., & Baguñà, J. (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Developmental Biology*, 280(1), 73-86.
- Bosch, P. S., Ziukaite, R., Alexandre, C., Basler, K., & Vincent, J.-P. (2017). Dpp controls growth and patterning in *Drosophila* wing precursors through distinct modes of action. *ELife*, 6.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401-415.
- Bridges, C. B. (1916). Non-Disjunction as Proof of the Chromosome Theory of Heredity (Concluded). *Genetics*, 1(2), 107-163.
- Brock, A. R., Seto, M., & Smith-Bolton, R. K. (2017). Cap-n-Collar Promotes Tissue Regeneration by Regulating ROS and JNK Signaling in the *Drosophila melanogaster* Wing Imaginal Disc. *Genetics*, 206(3), 1505-1520.

- Brook, W. J., Ostafichuk, L. M., Piorecky, J., Wilkinson, M. D., Hodgetts, D. J., & Russell, M. A. (1993). Gene expression during imaginal disc regeneration detected using enhancer-sensitive P-elements. *Development (Cambridge, England)*, 117(4), 1287-1297.
- Bryant, P. J. (1971). Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 26(4), 637-651.
- Buttitta, L. A., Katzaroff, A. J., & Edgar, B. A. (2010). A robust cell cycle control mechanism limits E2F-induced proliferation of terminally differentiated cells in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 189(6), 981-996.
- Buttitta, L. A., Katzaroff, A. J., Perez, C. L., de la Cruz, A., & Edgar, B. A. (2007). A double-assurance mechanism controls cell cycle exit upon terminal differentiation in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 12(4), 631-643.
- Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.-C., & Galliot, B. (2009). Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Developmental Cell*, 17(2), 279-289.
- Choksi, S. P., Southall, T. D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B. E., van Steensel, B., Micklem, G., & Brand, A. H. (2006). Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Developmental Cell*, 11(6), 775-789.
- Cohen, B., Simcox, A. A., & Cohen, S. M. (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development (Cambridge, England)*, 117(2), 597-608.
- Colombani, J., Andersen, D. S., Boulan, L., Boone, E., Romero, N., Virolle, V., Texada, M., & Léopold, P. (2015). *Drosophila* Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability. *Current Biology: CB*, 25(20), 2723-2729.
- Colombani, J., Andersen, D. S., & Léopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6081), 582-585.
- Crozatier, M., Glise, B., & Vincent, A. (2002). Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of collier/knot in the AP organiser.

Bibliografía

Development (Cambridge, England), 129(18), 4261-4269.

De Celis, J. F. (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25(5), 443-451.

de Celis, J. F., & Barrio, R. (2000). Function of the spalt/spalt-related gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mechanisms of Development*, 91(1-2), 31-41.

de Celis, J. F., Barrio, R., & Kafatos, F. C. (1996). A gene complex acting downstream of dpp in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature*, 381(6581), 421-424.

de Nooij, J. C., Letendre, M. A., & Hariharan, I. K. (1996). A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell*, 87(7), 1237-1247.

De Velasco, B., Shen, J., Go, S., & Hartenstein, V. (2004). Embryonic development of the *Drosophila* corpus cardiacum, a neuroendocrine gland with similarity to the vertebrate pituitary, is controlled by sine oculis and glass. *Developmental Biology*, 274(2), 280-294.

Diaz-Benjumea, F. J., & Cohen, S. M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell*, 75(4), 741-752.

Díaz-García, S., & Baonza, A. (2013). Pattern reorganization occurs independently of cell division during *Drosophila* wing disc regeneration in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), 13032-13037.

Dimova, D. K., Stevaux, O., Frolov, M. V., & Dyson, N. J. (2003). Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway. *Genes & Development*, 17(18), 2308-2320.

Diwanji, N., & Bergmann, A. (2019). Two Sides of the Same Coin—Compensatory Proliferation in Regeneration and Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1167, 65-85.

Drenckhahn, J.-D., Schwarz, Q. P., Gray, S., Laskowski, A., Kiriazis, H., Ming, Z., Harvey,

- R. P., Du, X.-J., Thorburn, D. R., & Cox, T. C. (2008). Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Developmental Cell*, 15(4), 521-533.
- Du, W., & Dyson, N. (1999). The role of RBF in the introduction of G1 regulation during *Drosophila* embryogenesis. *The EMBO Journal*, 18(4), 916-925.
- Du, W., & Pogoriler, J. (2006). Retinoblastoma family genes. *Oncogene*, 25(38), 5190-5200.
- Dunphy, W. G., & Kumagai, A. (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, 67(1), 189-196.
- D'Uva, G., Aharonov, A., Lauriola, M., Kain, D., Yahalom-Ronen, Y., Carvalho, S., Weisinger, K., Bassat, E., Rajchman, D., Yifa, O., Lysenko, M., Konfino, T., Hegesh, J., Brenner, O., Neeman, M., Yarden, Y., Leor, J., Sarig, R., Harvey, R. P., & Tzahor, E. (2015). ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature Cell Biology*, 17(5), 627-638.
- Edgar, B. A., & Datar, S. A. (1996). Zygotic degradation of two maternal Cdc25 mRNAs terminates *Drosophila*'s early cell cycle program. *Genes & Development*, 10(15), 1966-1977.
- Eun, S. H., Feng, L., Cedeno-Rosario, L., Gan, Q., Wei, G., Cui, K., Zhao, K., & Chen, X. (2017). Polycomb Group Gene E(z) Is Required for Spermatogonial Dedifferentiation in *Drosophila* Adult Testis. *Journal of Molecular Biology*, 429(13), 2030-2041.
- Faunes, F., Gundermann, D. G., Muñoz, R., Bruno, R., & Larraín, J. (2017). The heterochronic gene Lin28 regulates amphibian metamorphosis through disturbance of thyroid hormone function. *Developmental Biology*, 425(2), 142-151.
- Firth, L. C., & Baker, N. E. (2005). Extracellular signals responsible for spatially regulated proliferation in the differentiating *Drosophila* eye. *Developmental Cell*, 8(4), 541-551.
- Fogarty, C. E., Diwanji, N., Lindblad, J. L., Tare, M., Amcheslavsky, A., Makhijani, K., Brückner, K., Fan, Y., & Bergmann, A. (2016). Extracellular Reactive Oxygen Species Drive Apoptosis-Induced Proliferation via *Drosophila* Macrophages. *Current Biology: CB*, 26(5), 575-584.

Bibliografía

- Fox, D. T., Cohen, E., & Smith-Bolton, R. (2020). Model systems for regeneration: *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 147(7).
- Fox, D. T., & Spradling, A. C. (2009). The *Drosophila* hindgut lacks constitutively active adult stem cells but proliferates in response to tissue damage. *Cell Stem Cell*, 5(3), 290-297.
- Fristrom, D., Gotwals, P., Eaton, S., Kornberg, T. B., Sturtevant, M., Bier, E., & Fristrom, J. W. (1994). Blistered: A gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 120(9), 2661-2671.
- Fukunaga, A., & Kondo, S. (1985). Evidence for cell-replacement repair of X-ray-induced teratogenic damage in male genital imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 151(2), 243-250.
- García-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Foundation Symposium*, 0(29), 161-182.
- García-Bellido, A., Ripoll, P., & Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nature: New Biology*, 245(147), 251-253.
- García-Bellido, Antonio. (2009). The cellular and genetic bases of organ size and shape in *Drosophila*. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(8-10), 1291-1303.
- Garza-Garcia, A. A., Driscoll, P. C., & Brockes, J. P. (2010). Evidence for the local evolution of mechanisms underlying limb regeneration in salamanders. *Integrative and Comparative Biology*, 50(4), 528-535.
- Gehrke, A. R., Neverett, E., Luo, Y.-J., Brandt, A., Ricci, L., Hulett, R. E., Gompers, A., Ruby, J. G., Rokhsar, D. S., Reddien, P. W., & Srivastava, M. (2019). Acoel genome reveals the regulatory landscape of whole-body regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6432).
- Geisbrecht, E. R., & Montell, D. J. (2004). A role for *Drosophila* IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell*, 118(1), 111-125.
- Glise, B., & Noselli, S. (1997). Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes & Development*, 11(13), 1738-1747.

- Goldman, J. A., Kuzu, G., Lee, N., Karasik, J., Gemberling, M., Foglia, M. J., Karra, R., Dickson, A. L., Sun, F., Tolstorukov, M. Y., & Poss, K. D. (2017). Resolving Heart Regeneration by Replacement Histone Profiling. *Developmental Cell*, 40(4), 392-404.e5.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferré-Marcó, D., & Modolell, J. (1996). Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell*, 85(1), 95-105.
- Gontijo, A. M., & Garelli, A. (2018). The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: A relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control. *Mechanisms of Development*, 154, 44-50.
- Grusche, F. A., Degoutin, J. L., Richardson, H. E., & Harvey, K. F. (2011). The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 350(2), 255-266.
- Guo, Y., Flegel, K., Kumar, J., McKay, D. J., & Buttitta, L. A. (2016). Ecdysone signaling induces two phases of cell cycle exit in *Drosophila* cells. *Biology Open*, 5(11), 1648-1661.
- Guzman, H., Sanders, K., Idica, A., Bochnakian, A., Jury, D., Daugaard, I., Zisoulis, D. G., & Pedersen, I. M. (2018). MiR-128 inhibits telomerase activity by targeting TERT mRNA. *Oncotarget*, 9(17), 13244-13253.
- Hadorn, E. (1968). Transdetermination in cells. *Scientific American*, 219(5), 110-114 passim.
- Halme, A., Cheng, M., & Hariharan, I. K. (2010). Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 20(5), 458-463.
- Harris, R. E., Setiawan, L., Saul, J., & Hariharan, I. K. (2016). Localized epigenetic silencing of a damage-activated WNT enhancer limits regeneration in mature *Drosophila* imaginal discs. *ELife*, 5.
- Harvey, K., & Tapon, N. (2007). The Salvador-Warts-Hippo pathway—An emerging tumour-suppressor network. *Nature Reviews. Cancer*, 7(3), 182-191.

Bibliografía

- Haynie, J. L., & Bryant, P. J. (1977). The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 183(2), 85-100.
- Henry, J. J., & Tsonis, P. A. (2010). Molecular and cellular aspects of amphibian lens regeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(6), 543-555.
- Herrera, S. C., & Bach, E. A. (2019). JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: From *Drosophila* to vertebrates. *Development (Cambridge, England)*, 146(2).
- Herrera, S. C., Martín, R., & Morata, G. (2013). Tissue homeostasis in the wing disc of *Drosophila melanogaster*: Immediate response to massive damage during development. *PLoS Genetics*, 9(4), e1003446.
- Herrera, S. C., & Morata, G. (2014). Transgressions of compartment boundaries and cell reprogramming during regeneration in *Drosophila*. *ELife*, 3, e01831. <https://doi.org/10.7554/eLife.01831>
- Hirose, K., Payumo, A. Y., Cutie, S., Hoang, A., Zhang, H., Guyot, R., Lunn, D., Bigley, R. B., Yu, H., Wang, J., Smith, M., Gillett, E., Muroy, S. E., Schmid, T., Wilson, E., Field, K. A., Reeder, D. M., Maden, M., Yartsev, M. M., ... Huang, G. N. (2019). Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition. *Science (New York, N.Y.)*, 364(6436), 184-188.
- Hou, X. S., Goldstein, E. S., & Perrimon, N. (1997). *Drosophila* Jun relays the Jun amino-terminal kinase signal transduction pathway to the Decapentaplegic signal transduction pathway in regulating epithelial cell sheet movement. *Genes & Development*, 11(13), 1728-1737.
- Huang, W., Feng, Y., Liang, J., Yu, H., Wang, C., Wang, B., Wang, M., Jiang, L., Meng, W., Cai, W., Medvedovic, M., Chen, J., Paul, C., Davidson, W. S., Sadayappan, S., Stambrook, P. J., Yu, X.-Y., & Wang, Y. (2018). Loss of microRNA-128 promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Nature Communications*, 9(1), 700.
- Huh, J. R., Guo, M., & Hay, B. A. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Current Biology: CB*, 14(14), 1262-1266.

- Huh, J. R., Vernooy, S. Y., Yu, H., Yan, N., Shi, Y., Guo, M., & Hay, B. A. (2004). Multiple apoptotic caspase cascades are required in nonapoptotic roles for *Drosophila* spermatid individualization. *PLoS Biology*, 2(1), E15.
- Hussey, R. G., Thompson, W. R., & Calhoun, E. T. (1927). THE INFLUENCE OF X-RAYS ON THE DEVELOPMENT OF *DROSOPHILA* LARVAE. *Science (New York, N.Y.)*, 66(1698), 65-66.
- Igaki, T., Pagliarini, R. A., & Xu, T. (2006). Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 16(11), 1139-1146.
- Iismaa, S. E., Kaidonis, X., Nicks, A. M., Bogush, N., Kikuchi, K., Naqvi, N., Harvey, R. P., Husain, A., & Graham, R. M. (2018). Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues. *NPJ Regenerative Medicine*, 3, 6.
- Ishida, T., Nakajima, T., Kudo, A., & Kawakami, A. (2010). Phosphorylation of Junb family proteins by the Jun N-terminal kinase supports tissue regeneration in zebrafish. *Developmental Biology*, 340(2), 468-479.
- Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H. E., Saito, Y., Waring, M. T., Dombkowski, D. M., Cheng, T., DePinho, R. A., Sharpless, N. E., & Scadden, D. T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 443(7110), 421-426.
- Jaszczak, J. S., & Halme, A. (2016). Arrested development: Coordinating regeneration with development and growth in *Drosophila melanogaster*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 40, 87-94.
- Jaszczak, J. S., Wolpe, J. B., Bhandari, R., Jaszczak, R. G., & Halme, A. (2016). Growth Coordination During *Drosophila melanogaster* Imaginal Disc Regeneration Is Mediated by Signaling Through the Relaxin Receptor Lgr3 in the Prothoracic Gland. *Genetics*, 204(2), 703-709.
- Jaszczak, J. S., Wolpe, J. B., Dao, A. Q., & Halme, A. (2015). Nitric Oxide Synthase Regulates Growth Coordination During *Drosophila melanogaster* Imaginal Disc Regeneration. *Genetics*, 200(4), 1219-1228.

Bibliografía

- Jiang, H., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Grenley, M. O., McEwen, D. G., & Edgar, B. A. (2009). Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell*, 137(7), 1343-1355.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., & Izpisua Belmonte, J. C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, 464(7288), 606-609.
- Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., & Karin, M. (1996). C-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*, 87(5), 929-939.
- Kanda, H., & Miura, M. (2004). Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *Journal of Biochemistry*, 136(1), 1-6.
- Kang, J., Hu, J., Karra, R., Dickson, A. L., Tornini, V. A., Nachtrab, G., Gemberling, M., Goldman, J. A., Black, B. L., & Poss, K. D. (2016). Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements. *Nature*, 532(7598), 201-206.
- Karpen, G. H., & Schubiger, G. (1981). Extensive regulatory capabilities of a *Drosophila* imaginal disk blastema. *Nature*, 294(5843), 744-747.
- Katsuyama, T., Comoglio, F., Seimiya, M., Cabuy, E., & Paro, R. (2015). During *Drosophila* disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell proliferation with Dilp8-mediated developmental delay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), E2327-2336.
- Katsuyama, T., & Paro, R. (2013). Innate immune cells are dispensable for regenerative growth of imaginal discs. *Mechanisms of Development*, 130(2-3), 112-121.
- Khan, S. J., Abidi, S. N. F., Skinner, A., Tian, Y., & Smith-Bolton, R. K. (2017). The *Drosophila* Duox maturation factor is a key component of a positive feedback loop that sustains regeneration signaling. *PLoS Genetics*, 13(7), e1006937.
- Kida, Y., Maeda, Y., Shiraishi, T., Suzuki, T., & Ogura, T. (2004). Chick Dach1 interacts with the Smad complex and Sin3a to control AER formation and limb development along the proximodistal axis. *Development (Cambridge, England)*, 131(17), 4179-4187.

- Kondo, S., Senoo-Matsuda, N., Hiromi, Y., & Miura, M. (2006). DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(19), 7258-7268.
- Kumar, S. (2004). Migrate, differentiate, proliferate, or die: Pleiotropic functions of an apical «apoptotic caspase». *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2004(254), pe49.
- La Fortezza, M., Schenk, M., Cosolo, A., Kolybaba, A., Grass, I., & Classen, A.-K. (2016). JAK/STAT signalling mediates cell survival in response to tissue stress. *Development (Cambridge, England)*, 143(16), 2907-2919.
- Lai, S.-L., & Lee, T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, 9(5), 703-709. <https://doi.org/10.1038/nn1681>
- Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F., & Vaessin, H. (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell*, 87(7), 1225-1235.
- Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L., & Paro, R. (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature*, 438(7065), 234-237.
- Ma, Y., McKay, D. J., & Buttitta, L. (2019). Changes in chromatin accessibility ensure robust cell cycle exit in terminally differentiated cells. *PLoS Biology*, 17(9), e3000378.
- Martín, M., Ostalé, C. M., & de Celis, J. F. (2017). Patterning of the *Drosophila* L2 vein is driven by regulatory interactions between region-specific transcription factors expressed in response to Dpp signalling. *Development (Cambridge, England)*, 144(17), 3168-3176.
- Matthews, K. A., Kaufman, T. C., & Gelbart, W. M. (2005). Research resources for *Drosophila*: The expanding universe. *Nature Reviews. Genetics*, 6(3), 179-193.
- McBrayer, Z., Ono, H., Shimell, M., Parvy, J.-P., Beckstead, R. B., Warren, J. T., Thummel, C. S., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L. I., & O'Connor, M. B. (2007). Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 13(6), 857-871.

Bibliografía

- Meserve, J. H., & Duronio, R. J. (2015). Scalloped and Yorkie are required for cell cycle re-entry of quiescent cells after tissue damage. *Development (Cambridge, England)*, 142(16), 2740-2751.
- Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5309), 60-66. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.60>
- Milán, M., Campuzano, S., & García-Bellido, A. (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 11687-11692.
- Mirsky, R., Woodhoo, A., Parkinson, D. B., Arthur-Farraj, P., Bhaskaran, A., & Jessen, K. R. (2008). Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *Journal of the Peripheral Nervous System: JPNS*, 13(2), 122-135.
- Mirth, C. K., & Riddiford, L. M. (2007). Size assessment and growth control: How adult size is determined in insects. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 29(4), 344-355.
- Mirth, C., Truman, J. W., & Riddiford, L. M. (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology: CB*, 15(20), 1796-1807.
- Morata, G. (2001). How *Drosophila* appendages develop. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(2), 89-97.
- Morata, G., & Lawrence, P. A. (1975). Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*. *Nature*, 255(5510), 614-617.
- Morata, G., & Lawrence, P. A. (1977). Homoeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila*. *Nature*, 265(5591), 211-216.
- Morgan, T. H. (1910). SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. *Science (New York, N.Y.)*, 32(812), 120-122.
- Narbonne-Reveau, K., & Maurange, C. (2019). Developmental regulation of regenerative potential in *Drosophila* by ecdysone through a bistable loop of ZBTB transcription factors.

PLoS Biology, 17(2), e3000149.

- Nijhout, H. F., Riddiford, L. M., Mirth, C., Shingleton, A. W., Suzuki, Y., & Callier, V. (2014). The developmental control of size in insects. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 3(1), 113-134.
- O'Brochta, D. A., & Bryant, P. J. (1987). Distribution of S-phase cells during the regeneration of *Drosophila* imaginal wing discs. *Developmental Biology*, 119(1), 137-142.
- O'Keefe, D. D., Thomas, S. R., Bolin, K., Griggs, E., Edgar, B. A., & Buttitta, L. A. (2012). Combinatorial control of temporal gene expression in the *Drosophila* wing by enhancers and core promoters. *BMC Genomics*, 13, 498.
- Øvrebø, J. I., & Edgar, B. A. (2018). Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 145(14).
- Pajcini, K. V., Corbel, S. Y., Sage, J., Pomerantz, J. H., & Blau, H. M. (2010). Transient inactivation of Rb and ARF yields regenerative cells from postmitotic mammalian muscle. *Cell Stem Cell*, 7(2), 198-213.
- Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martín-Blanco, E., & García-Bellido, A. (2004). Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Developmental Cell*, 7(3), 387-399.
- Pastor-Pareja, J. C., Wu, M., & Xu, T. (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms*, 1(2-3), 144-154; discussion 153.
- Pérez-Garijo, A. (2018). When dying is not the end: Apoptotic caspases as drivers of proliferation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 82, 86-95.
- Pérez-Garijo, A., Fuchs, Y., & Steller, H. (2013). Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. *ELife*, 2, e01004.
- Pérez-Garijo, A., Martín, F. A., & Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 131(22), 5591-5598.

Bibliografía

- Pérez-Garijo, A., Shlevkov, E., & Morata, G. (2009). The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development (Cambridge, England)*, 136(7), 1169-1177.
- Pérez-Garijo, A., & Steller, H. (2015). Spreading the word: Non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development (Cambridge, England)*, 142(19), 3253-3262.
- Poon, R. Y. C. (2016). Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1342, 3-19.
- Potter, C. J., Tasic, B., Russler, E. V., Liang, L., & Luo, L. (2010). The Q system: A repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell*, 141(3), 536-548.
- Qi, S., & Calvi, B. R. (2016). Different cell cycle modifications repress apoptosis at different steps independent of developmental signaling in *Drosophila*. *Molecular Biology of the Cell*, 27(12), 1885-1897.
- Repiso, A., Bergantiños, C., & Serras, F. (2013). Cell fate respecification and cell division orientation drive intercalary regeneration in *Drosophila* wing discs. *Development (Cambridge, England)*, 140(17), 3541-3551.
- Ruijtenberg, S., & van den Heuvel, S. (2016). Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 15(2), 196-212.
- Sánchez-Iranzo, H., Galardi-Castilla, M., Minguillón, C., Sanz-Morejón, A., González-Rosa, J. M., Felker, A., Ernst, A., Guzmán-Martínez, G., Mosimann, C., & Mercader, N. (2018). Tbx5a lineage tracing shows cardiomyocyte plasticity during zebrafish heart regeneration. *Nature Communications*, 9(1), 428.
- Santabárbara-Ruiz, P., López-Santillán, M., Martínez-Rodríguez, I., Binagui-Casas, A., Pérez, L., Milán, M., Corominas, M., & Serras, F. (2015). ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during *Drosophila* Regeneration. *PLoS Genetics*, 11(10), e1005595.

- Schubiger, G. (1971). Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg disc of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 26(2), 277-295. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(71\)90127-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(71)90127-8)
- Schubiger, M., & Palka, J. (1987). Changing spatial patterns of DNA replication in the developing wing of *Drosophila*. *Developmental Biology*, 123(1), 145-153. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90436-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90436-2)
- Schuster, K. J., & Smith-Bolton, R. K. (2015). Taranis Protects Regenerating Tissue from Fate Changes Induced by the Wound Response in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 34(1), 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.017>
- Sheng, X. R., Brawley, C. M., & Matunis, E. L. (2009). Dedifferentiating spermatogonia outcompete somatic stem cells for niche occupancy in the *Drosophila* testis. *Cell Stem Cell*, 5(2), 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.024>
- Shlevkov, E., & Morata, G. (2012). A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, 19(3), 451-460. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.113>
- Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, 19(21), 2638-2644. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203522>
- Simón, R., Aparicio, R., Housden, B. E., Bray, S., & Busturia, A. (2014). *Drosophila* p53 controls Notch expression and balances apoptosis and proliferation. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 19(10), 1430-1443. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1000-5>
- Simpson, P., Berreur, P., & Berreur-Bonnenfant, J. (1980). The initiation of pupariation in *Drosophila*: Dependence on growth of the imaginal discs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 57, 155-165.
- Skinner, A., Khan, S. J., & Smith-Bolton, R. K. (2015). Trithorax regulates systemic signaling during *Drosophila* imaginal disc regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 142(20), 3500-3511.
- Slack, J. M. (2017). Animal regeneration: Ancestral character or evolutionary novelty? *EMBO*

Reports, 18(9), 1497-1508.

Smith-Bolton, R. K., Worley, M. I., Kanda, H., & Hariharan, I. K. (2009). Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. *Developmental Cell*, 16(6), 797-809.

Soufi, A., & Dalton, S. (2016). Cycling through developmental decisions: How cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. *Development (Cambridge, England)*, 143(23), 4301-4311.

Sparmann, A., & van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(11), 846-856.

Spradling, A. C., & Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 218(4570), 341-347.

Stapleton, M., Liao, G., Brokstein, P., Hong, L., Carninci, P., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Champe, M., Pacle, J., Wan, K., Yu, C., Carlson, J., George, R., Celniker, S., & Rubin, G. M. (2002). The *Drosophila* gene collection: Identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome Research*, 12(8), 1294-1300.

Stewart, S., Tsun, Z.-Y., & Izpisua Belmonte, J. C. (2009). A histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), 19889-19894.

Sun, G., & Irvine, K. D. (2011). Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Developmental Biology*, 350(1), 139-151.

Sun, L., Gu, L., Tan, H., Liu, P., Gao, G., Tian, L., Chen, H., Lu, T., Qian, H., Fu, Z., & Pan, X. (2019). Effects of 17 α -ethinylestradiol on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. *The Science of the Total Environment*, 653, 10-22.

Sun, T., Pikiólek, M., Orsini, V., Bergling, S., Holwerda, S., Morelli, L., Hoppe, P. S., Planas-Paz, L., Yang, Y., Ruffner, H., Bouwmeester, T., Lohmann, F., Terracciano, L. M., Roma, G., Cong, F., & Tchorz, J. S. (2020). AXIN2⁺ Pericentral Hepatocytes Have Limited Contributions to Liver Homeostasis and Regeneration. *Cell Stem Cell*, 26(1), 97-107.e6.

- Sunderland, M. E. (2010). Regeneration: Thomas Hunt Morgan's window into development. *Journal of the History of Biology*, 43(2), 325-361.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z., & Kornberg, T. B. (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development (Cambridge, England)*, 121(10), 3359-3369.
- Tamori, Y., & Deng, W.-M. (2013). Tissue repair through cell competition and compensatory cellular hypertrophy in postmitotic epithelia. *Developmental Cell*, 25(4), 350-363.
- Tamori, Y., & Deng, W.-M. (2014). Compensatory cellular hypertrophy: The other strategy for tissue homeostasis. *Trends in Cell Biology*, 24(4), 230-237.
- Uyehara, C. M., Nystrom, S. L., Niederhuber, M. J., Leatham-Jensen, M., Ma, Y., Buttitta, L. A., & McKay, D. J. (2017). Hormone-dependent control of developmental timing through regulation of chromatin accessibility. *Genes & Development*, 31(9), 862-875.
- Verghese, S., & Su, T. T. (2016). *Drosophila* Wnt and STAT Define Apoptosis-Resistant Epithelial Cells for Tissue Regeneration after Irradiation. *PLoS Biology*, 14(9), e1002536.
- Vizcaya-Molina, E., Klein, C. C., Serras, F., Mishra, R. K., Guigó, R., & Corominas, M. (2018). Damage-responsive elements in *Drosophila* regeneration. *Genome Research*, 28(12), 1852-1866.
- Wangler, M. F., Yamamoto, S., & Bellen, H. J. (2015). Fruit flies in biomedical research. *Genetics*, 199(3), 639-653.
- Wells, B. S., & Johnston, L. A. (2012). Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in *Drosophila* by p53. *Developmental Biology*, 361(2), 263-276.
- Wells, B. S., Yoshida, E., & Johnston, L. A. (2006). Compensatory proliferation in *Drosophila* imaginal discs requires Dronc-dependent p53 activity. *Current Biology: CB*, 16(16), 1606-1615.
- Whitehead, G. G., Makino, S., Lien, C.-L., & Keating, M. T. (2005). Fgf20 is essential for initiating zebrafish fin regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5756), 1957-1960.

- Worley, M. I., Alexander, L. A., & Hariharan, I. K. (2018). CtBP impedes JNK- and Upd/STAT-driven cell fate misspecifications in regenerating *Drosophila* imaginal discs. *ELife*, 7.
- Worley, M. I., Setiawan, L., & Hariharan, I. K. (2012). Regeneration and transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Annual Review of Genetics*, 46, 289-310.
- Wu, M., Pastor-Pareja, J. C., & Xu, T. (2010). Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature*, 463(7280), 545-548.
- Wu, Y., Zhou, L., Liu, H., Duan, R., Zhou, H., Zhang, F., He, X., Lu, D., Xiong, K., Xiong, M., Zhuang, J., Liu, Y., Li, L., Liang, D., & Chen, Y.-H. (2020). LRP6 downregulation promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Cell Research*.
- Xu, W., Comhair, S. A. A., Zheng, S., Chu, S. C., Marks-Konczalik, J., Moss, J., Haque, S. J., & Erzurum, S. C. (2003). STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(1), L137-148.
- Yokoyama, H., Yonei-Tamura, S., Endo, T., Izpisua Belmonte, J. C., Tamura, K., & Ide, H. (2000). Mesenchyme with fgf-10 expression is responsible for regenerative capacity in *Xenopus* limb buds. *Developmental Biology*, 219(1), 18-29.
- Zecca, M., Basler, K., & Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development (Cambridge, England)*, 121(8), 2265-2278.
- Zecca, Myriam, & Struhl, G. (2002). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development (Cambridge, England)*, 129(6), 1357-1368.
- Zhang, B., Mehrotra, S., Ng, W. L., & Calvi, B. R. (2014). Low levels of p53 protein and chromatin silencing of p53 target genes repress apoptosis in *Drosophila* endocycling cells. *PLoS Genetics*, 10(9), e1004581.

ANEXO

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en el siguiente artículo:

Ahmed-de-Prado, S., Diaz-Garcia, S., & Baonza, A. (2018). JNK and JAK/STAT signalling are required for inducing loss of cell fate specification during imaginal wing discs regeneration in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 441(1), 31-41.

Durante el período de desarrollo de esta tesis el doctorando ha publicado los siguientes artículos:

Diaz-Garcia, S., Ahmed, S., & Baonza, A. (2016). Analysis of the Function of Apoptosis during Imaginal Wing Disc Regeneration in *Drosophila melanogaster*. *PloS One*, 11(11), e0165554.

Ahmed-de-Prado, S., & Baonza, A. (2018). *Drosophila* as a Model System to Study Cell Signaling in Organ Regeneration. *BioMed Research International*, 2018, 7359267.



JNK and JAK/STAT signalling are required for inducing loss of cell fate specification during imaginal wing discs regeneration in *Drosophila melanogaster*

Sara Ahmed-de-Prado^{a,1}, Sandra Diaz-Garcia^{b,1}, Antonio Baonza^{a,*}

^a Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC/UAM, C/Nicolás Cabrera 1, Madrid 28049, Spain

^b University of California, San Diego Section of Cell & Developmental Biology, La Jolla, CA 92093-0349, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Regeneration
JNK signalling
JAK/STAT signalling
Imaginal discs
Drosophila

ABSTRACT

The regenerative process after tissue damage relies on a variety of cellular responses that includes compensatory cell proliferation and cell fate re-specification. The identification of the signalling networks regulating these cellular events is a central question in regenerative biology. Tissue regeneration models in *Drosophila* have shown that two of the signals that play a fundamental role during the early stages of regeneration are the c-Jun N-terminal kinase (JNK) and JAK/STAT signalling pathways. These pathways have been shown to be required for controlling regenerative proliferation, however their contribution to the processes of cellular reprogramming and cell fate re-specification that take place during regeneration are largely unknown. Here, we present evidence for a previously unrecognised function of the cooperative activities of JNK and JAK/STAT signalling pathways in inducing loss of cell fate specification in imaginal discs. We show that co-activation of these signalling pathways induces both the cell fate changes in injured areas, as well as in adjacent cells. We have also found that this function relies on the activity of the Caspase initiator encoded by the gene *dronc*.

1. Introduction

Most animal species have the ability to recover from organ damage by a process known as regeneration (Tanaka and Reddien, 2011; Brookes and Kumar, 2008). Restoration of the damaged organ involves multiple cellular processes, such as regenerative growth, and cellular reprogramming. All of these processes are initiated by the activity of different signalling pathways. There are multiple studies that have analysed the signals that promote regenerative growth from the wound edges (Sun and Irvine, 2014). However, much less is known about the mechanisms that regulate cellular reprogramming and re-patterning during regeneration. Another unresolved question is how the different pathways that operate in regeneration act in coordination to regulate all the events involved in this complex process.

The imaginal discs of *Drosophila melanogaster* are one of the model systems that have been extensively used to study the genetic mechanisms that regulate regeneration (Bergantinos et al., 2010b; Bryant, 1971, 1975; Hadorn and Buck, 1962; Schubiger, 1971; Worley et al., 2012). During larval stages, until the beginning of metamorphosis, the imaginal discs maintain the ability to regenerate (Bergantinos et al., 2010b; Worley et al., 2012; Diaz-Garcia and

Baonza, 2013; Smith-Bolton et al., 2009). It is also during larval stages when the characteristic veins and intervein pattern observed in the adult wings are defined. The restricted function of different genes in specific regions of the larval wing disc promotes intervein or vein cell fate (De Celis, 2003). It has been shown that in regenerating discs the vein/intervein pattern defined by the expression of different patterning genes is temporarily eliminated in the wound edges as well as in large regions of the discs (Smith-Bolton et al., 2009; Diaz-Garcia and Baonza, 2013; Repiso et al., 2013). Accordingly, it has been proposed that a re-patterning process takes place in the early stages of disc regeneration, which implies the temporary loss of cell fate commitment (Smith-Bolton et al., 2009; Diaz-Garcia and Baonza, 2013; Repiso et al., 2013; Herrera and Morata, 2014; Morata and Herrera, 2016). The signals required to induce cell fate changes are largely unknown.

One of the signals that has been shown to play a fundamental role during regeneration is the c-Jun N-terminal kinase (JNK). This pathway is initially triggered at the wound site in response to cellular stress (Bosch et al., 2005), and plays a fundamental role in regulating many biological processes involved in regeneration (Lee et al., 2005; Bogoyevitch et al., 2010; Bosch et al., 2005, 2008; Bergantinos et al., 2010a; Pastor-Pareja et al., 2008; Chen, 2012). Inhibition of JNK

* Corresponding author.

E-mail address: abaonza@cbm.csic.es (A. Baonza).

¹ These authors contributed equally to this work.

function during disc regeneration impairs wound healing and reduces regenerative proliferation (Ramet et al., 2002; Mattila et al., 2005; Bosch et al., 2005, 2008). During disc regeneration, JNK signalling promotes the activation of at least two downstream pathways: JAK/STAT and Wingless (*wg*) (Harris et al., 2016; Katsuyama et al., 2015; Pastor-Pareja et al., 2008; Smith-Bolton et al., 2009). *Drosophila* has three leptin-like (IL-6 family) cytokine ligands known as Unpaireds (Upd, Upd2, Upd3). These proteins bind to the IL-6R type receptor, *Domeless* (*dome*), that activates a Janus kinase (JAK). In *Drosophila*, this kinase is encoded by the gene *hopscotch* (*hop*). This phosphorylation cascade promotes the translocation of STAT92E transcription factor to the nucleus (Arbouzova and Zeidler, 2006). During disc regeneration it has been shown that the reduction of JAK/STAT function impairs cell proliferation and prevents normal recovery (Katsuyama et al., 2015; Santabarbara-Ruiz et al., 2015; La Fortezza et al., 2016). Accordingly, it has been proposed that JAK/STAT signalling functions downstream of JNK signalling by mediating compensatory cell proliferation (Katsuyama et al., 2015). However, it has recently been proposed that instead of promoting compensatory cell proliferation, JAK/STAT might be necessary to restrain excessive tissue damage caused by the activation of the JNK pathway, and may facilitate initiation of compensatory responses (La Fortezza et al., 2016). Therefore, the contribution of JAK/STAT signalling to the compensatory cell proliferation induced by JNK signalling is unclear. It is also unknown whether JAK/STAT and JNK signalling are involved in the processes of tissue re-patterning and loss of cell fate commitment associated with regeneration.

To better understand the role of JNK and JAK/STAT signalling in tissue re-patterning and loss of cell fate commitment in response to damage, we have used a combination of genetic techniques and surgical excision. The results presented here identify a previously unrecognised function for cooperative JNK and JAK/STAT signalling in the induction of loss of cell fate specification. Our data indicate that the ectopic activation of JNK signalling is sufficient to induce loss of cell fate commitment markers autonomously, as well as non-autonomously, in surrounding non JNK-expressing cells, independently of the apoptotic function of this pathway. These effects are strongly enhanced when JNK and JAK/STAT are co-activated, suggesting that both pathways synergize in the process of inducing loss of cell fate specification. Interestingly, we have found that the Caspase initiator *Dronc* is necessary to promote non-autonomous cell fate changes in response to the activation of JNK signalling. All together our data provide important insights into the mechanisms through which the activities of these two signalling pathways can regulate cell fate decisions in response to tissue damage.

2. Materials and methods

2.1. *Drosophila* stocks and genetics

The following stocks and *Gal4* lines were used:

The *UAS* lines used included: *UAS-GFP* (Bloomington stock center), *UAS-hep^{CA}* (II) (III) (Adachi-Yamada et al., 1999), *UAS-dome^{DN}* (II) (Sotillos et al., 2008), *UAS-hop^{tum-l}* (II) {Harrison et al. (1995) #883}, *UAS-hop^{RNAi}* (*TRIP-v20*) (Bloomington *Drosophila* Stock Center: 32966), *UAS-microRNARHG* (II) (Siegrist et al., 2010) (a gift from C. Estella) and *UAS-reaper* (Bloomington *Drosophila* Stock Center: 5823). Mutant *droncⁱ²⁹* and *droncⁱ²⁴* (a gift from G. Morata) (Xu et al., 2005).

We used the *Gal4* lines: *en-Gal4 UAS-GFP/CyO*; *Tub-Gal 80^{TS}/TM6B*, *UAS-hep^{CA}UAS-GFP Tub-Gal80^{TS}*; *droncⁱ²⁹ hh-Gal4/TM6B*, and *w*; *Tub-Gal80^{TS}/CyO*; *hh-Gal4/TM6B*. We obtained these lines from Gines Morata (CBM, Madrid) (Perez-Garijo et al., 2009). All of these stocks have been previously described in FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

The reporter lines: *puc-LacZ* line (Martin-Blanco et al., 1998),

bs^{P1292} [lac-Z rosy+] insertion *l(2)03267* (Roch et al., 1998), TRE-DsRed (Chatterjee and Bohmann, 2012) and *10XSTAT92E-GFP* (Bach et al., 2007).

Stocks and crosses were maintained on yeast food at 25 °C before and after the transitory inhibition of *Gal80^{TS}* at 29 °C.

2.2. Genetic analysis

This analysis was performed by crossing *en-Gal4 UAS-GFP/CyO*; *Tub-Gal80^{TS}/TM6B* to the following stocks:

UAS-dome^{DN}; *UAS-hep^{CA}*

UAS-dome^{DN}; *UAS-GFP/TM6B*

UAS-GFP; *UAS-hep^{CA}*

UAS-hop^{tum-l}; *UAS-hep^{CA}*

UAShop^{tum-l}; *UAS-GFP/TM6B*

UAS-hop^{RNAi} (*TRIP-v20*) (Bloomington *Drosophila* Stock Center: 32966)

UAS-hep^{CA}; *UAS-hop^{RNAi}* (*TRIP-v20*)

UAS-microRNARHG; *UAS-hep^{CA}*

UAS-microRNARHG; *MKRS/TM6B*

en-Gal4 Tub-Gal80^{TS} bs^{P1292}

Analysis of the expression pattern of different markers in control animals were performed by crossing *en-Gal4 UAS-GFP/CyO* flies to *UAS-GFP*.

To study the effect of ectopic expression of the different *UAS* lines used in our analysis *en-Gal4 Tub-Gal80^{TS} UAS- X* larvae (where X indicates the different transgenes used in our assay) were raised at 25 °C until 132±12 hs AEL, at which point the larvae were shifted to 29 °C for 24 hs and then shifted back to 25 °C. We analysed the effects caused by the overexpression of the different *UAS* lines immediately after the end of the shift to 29 °C (T0), and 24 hs later (T1) (Fig. S1).

To activate JNK signalling in *dronc* mutants, *UAS-GFP UAS-hep^{CA} Tub-Gal80^{TS}*; *droncⁱ²⁹ hh-Gal4/TM6B* flies were crossed to *w*; *If/CyO*; *droncⁱ²⁴/TM6B* or *w*; *Tub-Gal80^{TS}*; *hh-Gal4* to *UAS-hep^{CA}*; *UAS-GFP* as a control.

2.3. Immunocytochemistry

Immunostaining of the wing discs was performed according to standard protocols. The following primary antibodies were used: rabbit anti-Phospho-histone 3 1:200 (Cell Signalling Technology), rabbit anti-cleaved Dcp1 1:200 (Cell Signalling Technology), rat anti-Araucan 1:200 (kindly provided by Sonsoles Campuzano), guinea pig anti-Knirps 1:500 and rabbit anti-Spalt major 1:200 (Gift from José Félix de Celis), mouse anti-β Galactosidase 1:200 (Promega), rat anti-Phospho-Mad 1:100 (from Gines Morata), and mouse anti-Wg (4D4; 1:100), were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa. Secondary antibodies (Molecular Probes) were used at dilutions of 1:200.

Imaginal discs were mounted in Vectashield mounting fluorescent medium (Vector Laboratories, Inc.).

2.4. Surgical amputation of Imaginal disc and analysis

en-Gal4 Tub-Gal80^{TS} UAS- X larvae were raised at 25 °C until the third instar larval stage (96±12 hs after egg lay), at which time the larvae were shifted to 29 °C for 24 hs and then a fragment of the posterior compartment was surgically amputated (108–132 hs AEL) as described in Diaz-Garcia and Baonza (2013).

The larvae used in this assay were:

en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; *Tub-Gal80^{TS}/+*, *en-Gal4 UAS-GFP UAS-puc Tub-Gal80^{TS} /+*, and *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-dome^{DN}*; *Tub-Gal80^{TS}/+*.

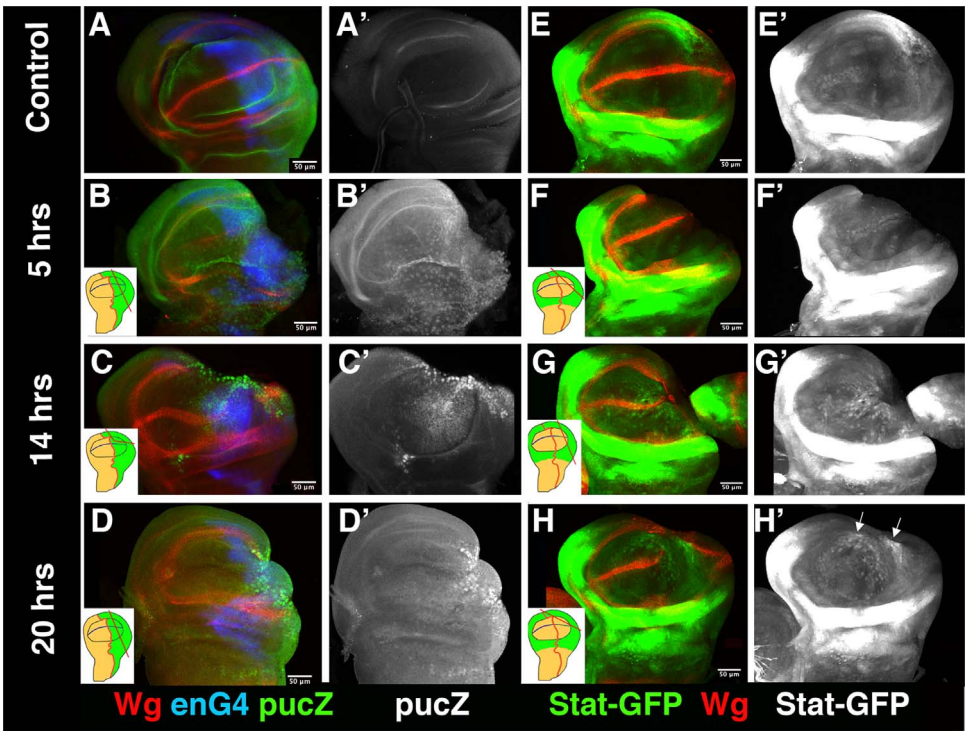


Fig. 1. Pattern of activation of JNK and STAT during wing disc regeneration. (A-D') Third instar *en-Gal4* UAS-GFP *puc-lacZ*/+ wing imaginal discs stained for anti-β-Galactosidase to detect the *puc-lacZ* expression pattern (green in A-D, and grey in A'-D') and anti-Wg (red in A-D). (E-H') Third instar wing imaginal discs carrying the *10XSTATGFP* reporter, stained for anti-Wg (red E-H). (A-A') Non-amputated control *en-Gal4* UAS-GFP *puc-lacZ*/+ and (E-E') *10XSTATGFP* disc. (B-B' and F-F') Regenerating wing disc at 5 h AC. We observed activation of JNK signalling pathway in the cells of the wound edge (B-B'). The expression of the *10XSTATGFP* reporter is similar to the control disc (F-F'). (C-C' and G-G') Regenerating wing disc at 14 h AC. At this time the activation of JNK in the disc cells is detected not only near the wound edge but also in regions far away from it (C-C'). Some cells near the wound edge expressed high levels of *10XSTATGFP* (G-G'). Note that the expression of Wg disappears at the dorsal/ventral (D/V) boundary close to the wound edge. (D-D') Regenerating wing disc at 20 h AC. At this time there is a reduction in the number of cells that activate JNK signalling pathway, but there are still a few ones adjacent to the wound edge. The expression of the *10XSTATGFP* reporter increases in some cells near the wound edges (H-H', arrows in H'). Schematic illustrations on the left indicate the cutting lines and the region eliminated in each case.

2.5. *In vitro* culture

Imaginal discs were cultured as described (Aldaz et al., 2010) except that we do not add Ecdysone to the medium. The discs cultivated were *puc-Lac-Z* /*10XSTAT92E-GFP*.

2.6. Statistical analysis

Suppression of effects is determined based on a shift in the percentages of the observed phenotypes, from Ara expression altered, either absent or down-regulated (L3 altered) to wild-type (discs without any observable effect or normal), that is significantly different based on a Pearson's chi-squared test. Degrees of freedom=1, $\chi^2 = 10.83$ at $p = 0.001$, and for Degrees of freedom = 2, $\chi^2 = 13.82$ at $p = 0.001$, expected values for phenotypes derived from replicate controls.

In all the data included in the text the variance indicated refers to Standard deviation (SD).

2.7. Quantitative analysis

Images were processed using the ImageJ software (NUH,Bethesda,USA). Each image analysed was a representative section of the wing disc. A high-intensity threshold that corresponded to the labelling with the antibody was adjusted for each image. Then, we generated a region of interest (ROI) that encompassed the posterior compartment and calculated the percentage of the ROI covered by the staining using the Area Fraction option in Set Measurements. The P-values were calculated using two-tailed Student's *t*-test.

2.8. Microscopy

Images were captured using a Confocal LSM510 Vertical Zeiss and processed with ImageJ or Adobe Photoshop CS3.

2.9. qPCR analysis

RNA from wild type, *UAS-GFP Tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA}*; *droneⁱ²⁹ hh-Gal4/ droneⁱ²⁴*, *UAS-GFP Tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA}*; *hh-Gal4/UAS-GFP* and *droneⁱ²⁴/droneⁱ²⁴* discs was extracted from +/−70 wing imaginal discs using Qiagen RNA later buffer, Zymo Research RNA MicroPrep and RNA Clean and Concentrator kits. RT reactions were performed using the iScript cDNA Synthesis kit (Biorad PN170–8891) following manufacturer's instructions. qPCR reactions were performed in a CX384 Real Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). The relative quantification data process was carried out with GenEx v. 5.4.4 (MultiD Analyses AB, Gothenburg, Sweden) software. Data were normalized to two housekeeping genes.

Primers used:

Housekeeping <i>RpL32</i>	Fwr	ATCGATATGCTAAGCTGTGCGAC
	Rev	GGCGACGCACTCTGTTGTC
Housekeeping <i>RpL13A</i>	Fwr	ATGACTGGTTTAACGAACAGGACC
	Rev	CACGGAGGCCAGGCG
<i>upd2</i>	Fwr	ACGAGTTATCAAGCGCAAGCA
	Rev	ATATCTTGGTATTCGCTCATCGTG
<i>upd3</i>	Fwr	ACAGATTCTGCCCCGTCCT
	Rev	GGTCGCGATGGGCGT

3. Results

3.1. Pattern of activation of JNK and JAK/STAT signalling during regeneration

In an attempt to better understand the requirement of Jun N-terminal Kinase (JNK) and JAK/STAT signalling pathways during wing disc regeneration, we first established the temporary pattern of activity of these pathways in amputated wing discs. To that end we used a method developed by us that allows the study of disc regeneration under physiological conditions (Diaz-Garcia and Baonza, 2013). To monitor the activity of JNK signalling we used a Lac-Z insertion in the gene *puckered* (*puc*) (Martin-Blanco et al., 1998). To examine JAK/STAT signalling activity we used the 10xSTAT-GFP transcriptional reporter, which contains multimerized copies of a Stat92E-responsive element (Bach et al., 2007).

We removed a fragment of the posterior compartment of *en-Gal4 UAS-GFP puc-Lac-Z* or *10 × Stat-GFP* third instar larvae wing discs (120–140 hs AEL) (Diaz-Garcia and Baonza, 2013), and analysed the expression of these reporters at different times after amputation (Fig. 1). Consistent with previous reports using other methods (Bosch et al., 2005) (Katsuyama et al., 2015; Pastor-Pareja et al., 2008; La Fortezza et al., 2016), we found that the JNK and JAK/STAT signalling pathways were activated during regeneration. At 5 h after cut (AC) JNK signalling was already active in the cells at the wound edge, (Fig. 1B–B'). As regeneration progressed (14 hs AC) the activity of the pathway strongly increased at the wound edge, and in regions adjacent to it, extending also to the anterior compartment, even though we only eliminated a fragment of the posterior compartment (Fig. 1C–C'). The activity of the reporter declined in most of the cells of the disc at 20 hs and it was only maintained at high levels in the region adjacent to the wound edge (Fig. 1D–D'). In control contralateral non-amputated discs we never observed expression of this reporter in the wing pouch region (Fig. 1). In the same interval of time, between 5 and 20 h AC, we found that the levels of expression of the 10xSTAT-GFP reporter increased in some cells close to the wound site between 14 and 20 hs AC (Fig. 1). These data indicate that during discs regeneration, JNK and JAK/STAT are activated, although whereas the activity of JNK signalling spreads throughout a large region of the discs, JAK/STAT signalling is restricted to some cells near the wound edge, as assayed by 10xSTAT-GFP reporter. We have confirmed this observation by analysing the expression of *puc-LacZ* and *10xSTAT-GFP* reporters at the same time in amputated discs that have been cultured in vitro (Fig. S2).

3.2. Down-regulation of JAK/STAT and JNK signalling partially prevents the loss of cell fate commitment in regenerating discs

In the third instar wing discs the characteristic vein/intervein pattern of the adult *Drosophila* wing is defined by the expression of several genes, such as Iro-Complex genes, that are specifically expressed in the pro-veins L3 and L5, or knirps (*Kni*) in the pro-vein L2 (De Celis, 2003) (Fig. 2A). In regenerating wing discs the expression of vein fate commitment markers is temporary lost, not only in the cells at the wound edge but also in adjacent cells (Fig. 2B) (Diaz-Garcia and Baonza, 2013). To examine whether the activation of JNK and/or JAK/STAT signalling is involved in this down-regulation, we have analysed the expression of Araucan (*Ara*) (a component of the Iro-Complex) and *Kni* in regenerating discs in which the function of JNK or JAK/STAT signalling pathways was compromised. Using the Gal4/UAS/Gal80^{TS} system we have blocked the activity of JNK signalling by over-expressing the phosphatase *puckered* (*puc*), which controls the activity of JNK signalling by a negative feedback loop. To eliminate the function of the JAK/STAT pathway we have over-expressed a dominant negative form of *Domeless* (*dome*) under the control of *engrailed-Gal4* line to restrict the expression of the transgenes to the cells of the

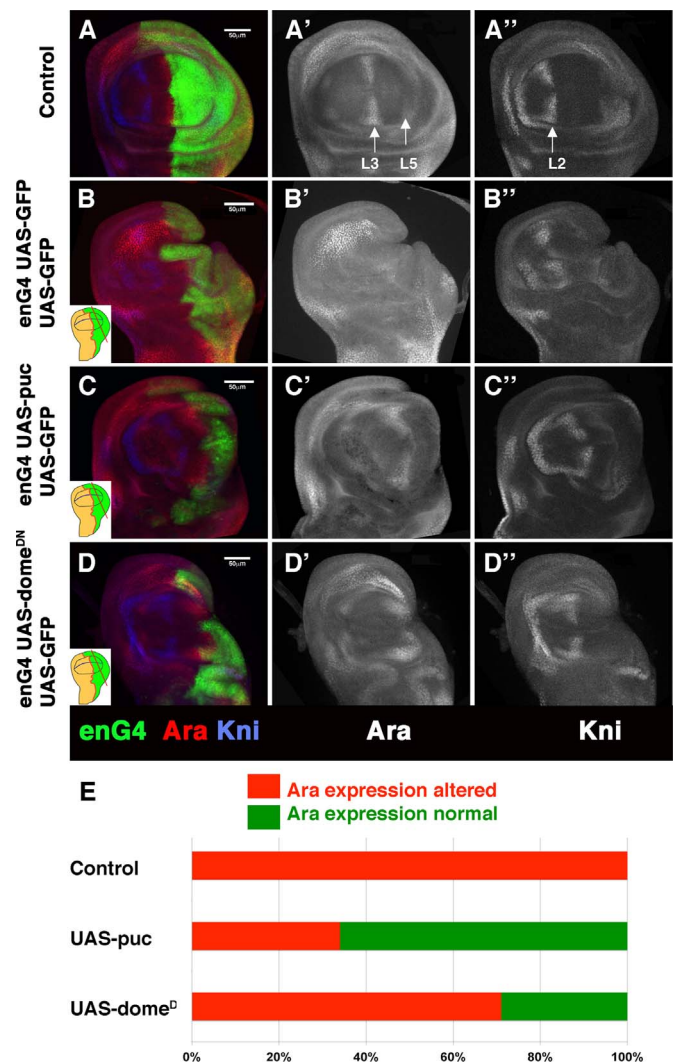


Fig. 2. JNK and JAK/STAT signalling are involved in regulating the expression of markers of cell fate commitment during regeneration. (A–D'') Third instar wing discs stained for anti-Araucan (*Ara*) (red in A–D, and grey in A'–D') and anti-Knirps (*Kni*) (blue in A–D, and grey in A'–D'). (A–A'') *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; Tub-Gal80^{TS}/+* control non regenerating discs. (B–B'') *en-Gal4 UAS-GFP; Tub-Gal80^{TS}* regenerating wing disc at 18 hs after cut (AC). In these discs, although we have only amputated a fragment of the P compartment, the expression of *Ara* in the anterior compartment (pro-vein L3) is either eliminated or reduced. The expression of *Kni* is not altered. (C–C'') Regenerating *en-Gal4 UAS-GFP/+; Tub-Gal80^{TS}/+UAS-puc* wing discs. In most of these discs the expression of *Ara* is not altered during regeneration (see E). (D–D'') In more than 30% of the *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-dome^{DN}; Tub-Gal80^{TS}/+* regenerating discs analysed the expression of *Ara* in the pro-vein L3 is not altered (E). Insets indicate the cutting lines and the region eliminated in each disc. (E) Bar chart shows the percentage of regenerating discs in which the expression of *Ara* in pro-vein L3 is either eliminated or reduced (*Ara* expression altered, in red) or non-affected (*Ara* expression normal, in green) in the different genotypes analysed. *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; Tub-Gal80^{TS}/+(Control)*; *en-Gal4 UAS-GFP/+; Tub-Gal80^{TS}/UAS-puc* (*UAS-puc*); *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-dome^{DN}; Tub-Gal80^{TS}/+(UAS-dome^{DN})*. Suppression is determined based on a shift in the percentage to wild-type (*Ara* expression normal) from *Ara* expression altered that is significantly different based on a Pearson's chi-square test for degrees of freedom = 1, $\chi^2 = 10.83$ at $p = 0.001$. See also the detailed statistical analysis in Fig. S3).

posterior compartment (see M & M). This approach enabled us to define the autonomous effects (posterior compartment), as well as any other possible non-autonomous effects in adjacent cells of the anterior compartment.

In contrast to control regenerating discs, in which the expression of *Ara* in pro-vein L3 was always altered, either eliminated or strongly down-regulated (Fig. 2B, E and Fig. S3), we found a high proportion of regenerating discs expressing *UAS-puc* (66% Fig. S3), in which the

expression of Ara was normal (Fig. 2 C-C'', E and Fig. S3). Similarly, down-regulation of JAK/STAT signalling in the posterior compartment by expressing *UAS-dome^{DN}* also partially suppresses the effects in pro-vein L3 observed in control regenerating discs (Fig. 2D-D', E and Fig. S3). The expression of *kni* in pro-vein L2 is not affected either in control regenerating discs or in discs expressing the transgenes (Fig. 2). This result indicates that the loss of pro-vein L3 is not due to a systemic response that delays vein specification. The vein pattern is not affected in contralateral non-regenerating discs expressing the transgenes used in our analysis (data not shown).

All together these results suggest that the function of JNK and JAK/STAT signalling are involved in the induction of loss of cell fate commitment observed during regeneration.

3.3. JAK/STAT signalling mediates the non-autonomous loss of markers of cell fate commitment induced by the activation of JNK-signalling

To further analyse the role of JNK signalling in the loss of cell fate specification, and its functional relationship with JAK/STAT signalling during tissue regeneration, we examined the effects caused by the ectopic activation of JNK signalling, while simultaneously reducing or increasing JAK/STAT signalling. To this end we have transiently expressed a constitutively activated form of the JNK-kinase Hemipterous (*hep^{CA}*) using the Gal4/UAS/Gal80^{TS} system in different mutant conditions. We used the *engrailed-Gal4* line to limit the expression of these transgenes to the cells of the posterior compartment. *en-Gal4 Tub-Gal80^{TS} UAS- X* larvae (where X indicates the different transgenes used in our assay) were raised at 25 °C until 132 ± 12 hs AEL, at which point the larvae were shifted to 29 °C for 24 hs (T0) and then shifted back to 25 °C. The discs were analysed at different times (see M & M and Fig. S1). At the time when the larvae were transferred to 29° to induce the expression of the different transgenes used in our assay (132 ± 12 hs AEL) the vein pattern was already established (Fig. 3A-A''). We found that in all discs analysed after over-expressing *UAS-hep^{CA}* (n = 31) the expression of Ara in pro-vein L5 (posterior compartment) was eliminated (Fig. 3C-C' and Fig. S3), likely this effect is caused because most of the cells in this region are dying (see below). Interestingly, we observed that the expression of Ara in pro-vein L3 in the anterior compartment was also always either eliminated or strongly down-regulated (Fig. 3 and Fig. S3). These effects are non-autonomously induced by the activation of *UAS-hep^{CA}* in the posterior compartment since *en-Gal4* is not active in pro-vein L3. The expression of *Kni* in pro-vein L2 was not affected in these discs (Fig. 3C-C''). To confirm the loss of vein/intervein commitment after activation of JNK signalling we analysed the expression of the intervein marker *Blistered (bs)* (Roch et al., 1998). In discs over-expressing *UAS-hep^{CA}* under the control of *en-Gal4*, the expression of Bs is reduced in both the posterior compartment, as well as in the region adjacent to the anterior/posterior boundary (Fig. S4). All together these results indicate that the ectopic activation of JNK pathway promotes changes in the fate of the cells in adjacent regions of damaged areas.

We next investigated the possible function of JAK/STAT signalling in mediating the loss of cell fate commitment induced by the ectopic activation of JNK signalling. We first analysed the expression of the 10xSTAT-GFP reporter in discs over-expressing *UAS-hep^{CA}* under the control of *en-Gal4* at different times after *UAS-hep^{CA}* induction. After over-expressing *UAS-hep^{CA}* for 16 hs we found that the 10xSTAT-GFP reporter was already active in the cells of the posterior compartment (Fig. S5C-C'). After 24hs of over-expressing *UAS-hep^{CA}* the activity of the reporter strongly increased in the cells of the posterior compartment (Fig. S5D-D'). These results indicate that in our experimental condition JNK signal activates JAK/STAT signalling pathway. Then we examined the effects caused by the over-expression of *UAS-hep^{CA}*

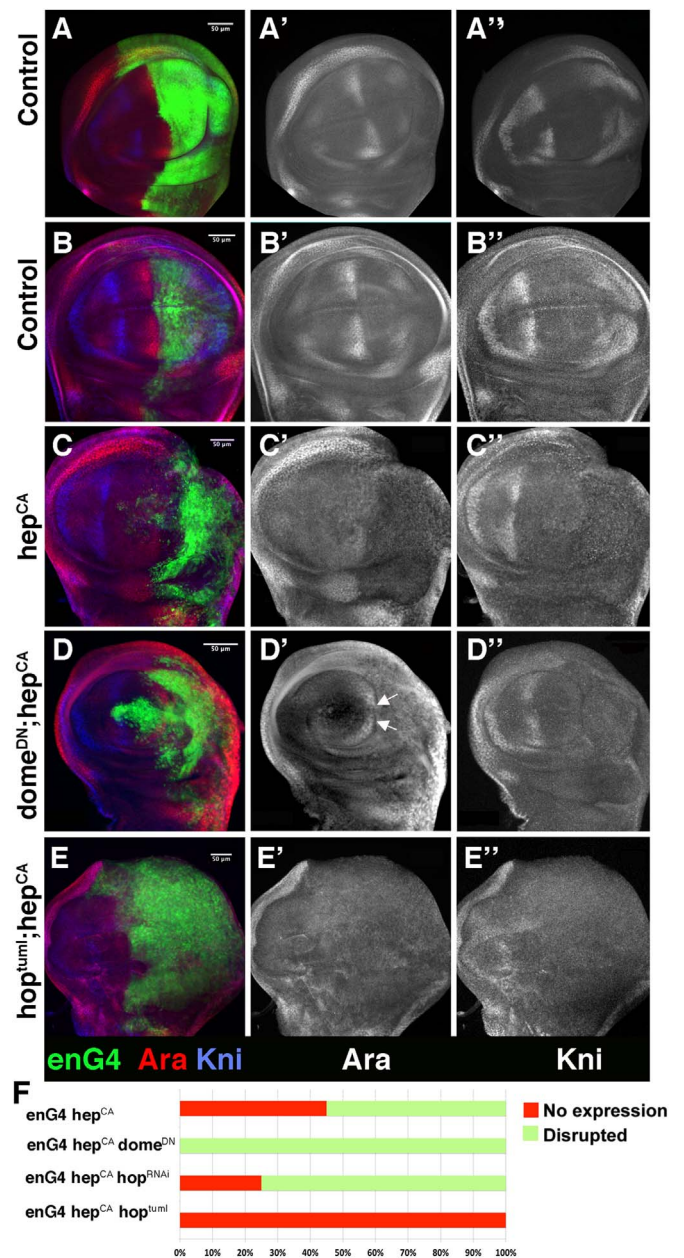


Fig. 3. JNK and JAK/STAT signalling pathways collaborate to induce non-autonomous down-regulation of markers of cell fate commitment. (A-E'') Third instar wing discs stained with anti-Araucan (Ara) (red in A-E, and grey in A'-E') and anti-Knirps (Kni) (blue in A-E, and grey in A'-E''). (A-A'') Control *en-Gal4 UAS-GFP; Tub-Gal80^{TS}* wing disc stained at 120 hs AEL for Ara and Knirps, showing that the vein patterning defined by the expression of these genes is already specified at this time. (B-B'') Control *en-Gal4 UAS-GFP; Tub-Gal80^{TS}* wing disc. (C-C'') The over-expression of *UAS-hep^{CA}* in the posterior compartment of *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-GFP; UAS-hep^{CA}/Tub-Gal80^{TS}* discs causes the down-regulation of Ara, not only in the cells of the posterior compartment, but also in the cells of the pro-vein L3 in the anterior compartment (C'). knirps expression is not affected (C''). (D-D'') *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-dome^{DN}; Tub-Gal80^{TS}/UAS-hep^{CA}* discs. The ectopic expression of *UAS-dome^{DN}* and *UAS-hep^{CA}* in these discs partially restores the levels of Ara in the cells of the pro-vein L3 (arrows in D'). (E-E'') In *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-hop^{ts1}; UAS-hep^{CA}/Tub-Gal80^{TS}* discs, the co-expression of *UAS-hop^{ts1}* and *UAS-hep^{CA}* in the posterior compartment eliminates the expression of Ara in the cells of the pro-vein L3 (E') and strongly down-regulates Kni in the cells of the pro-vein L2 (E''). (F) Bar chart shows the percentage of discs in which the expression of Ara in pro-vein L3 is either eliminated (No expression) or partially eliminated (disrupted) in the different genotypes analysed. The suppression is determined based on a shift in the percentage from No expression to disrupted that is significantly different based on a Pearson's chi-square test for degrees of freedom = 2, $\chi^2 = 13.82$ at $p = 0.001$. See also the detailed statistical analysis in Fig. S3.

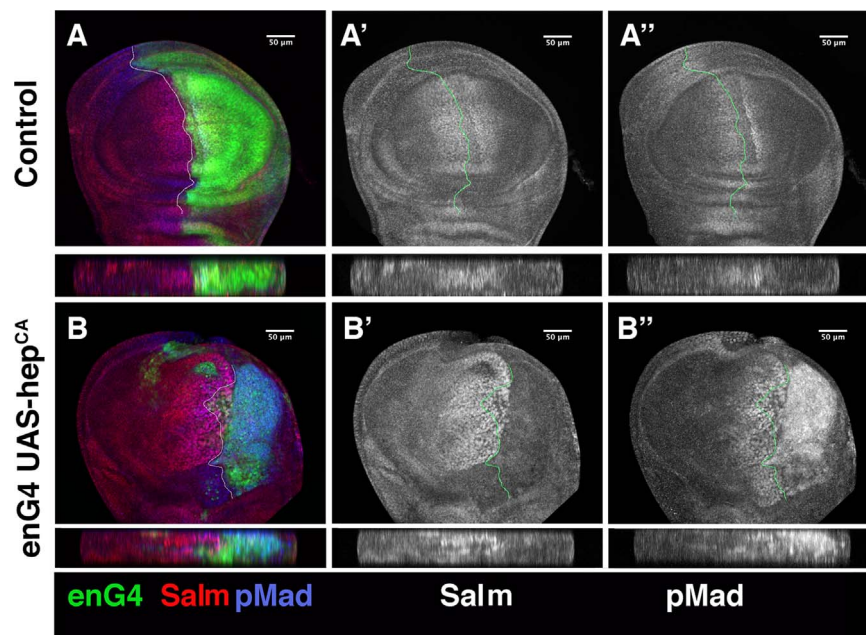


Fig. 4. The ectopic activation of JNK signalling in the posterior compartment does not affect the activity of *dpp* signalling in the a/p boundary. (A–B'') Third instar wing discs stained with anti-Salm (Salm) (red in A–B, and grey in A'–B') and anti-pMad (blue in A–B, and grey in A'–B''). (A–A'') Control *en-Gal4 UAS-GFP; Tub-Gal80^{TS}* wing disc. The white line indicates the a/p boundary. (B–B'') The over-expression of *UAS-hep^{CA}* in the posterior compartment of *en-Gal4 UAS-GFP; UAS-hep^{CA}/Tub-Gal80^{TS}* discs causes the down-regulation of Salm and the up-regulation of pMad in the posterior compartment, but in the anterior compartment the expression of Salm and pMad are similar to control discs. Note that the range of expression of both proteins is similar in control and discs expressing *UAS-hep^{CA}* (see text). Transversal sections are shown below the figures.

under the control of *en-Gal4* at the same time that the activity of JAK/STAT signalling was blocked by overexpressing either: *UAS-dome^{DN}* or *UAS-hop^{RNAi}* (see M & M). In contrast to discs over-expressing only *UAS-hep^{CA}*, we found that in discs co-overexpressing *UAS-hep^{CA}* and *UAS-dome^{DN}*, the expression of Ara was never completely eliminated in pro-vein L3 (Fig. 3D–D'', F and Fig. S3). In discs co-expressing *UAS-hep^{CA}* and *UAS-hop^{RNAi}* the percentage of discs with this phenotype was strongly reduced compared with discs expressing only *UAS-hep^{CA}* (45% *UAS-hep^{CA}* vs 25% *UAS-hep^{CA}/UAS-hop^{RNAi}*, Fig. 3F and Fig. S3). In concordance with these results, we found that in the anterior compartment of *en-Gal4 UAS-GFP bs-lacZ UAS-dome^{DN}/UAS-hep^{CA}* *Tub-Gal 80^{TS}* discs the vein/intervein pattern defined by Bs was only partially altered (Fig. S4D–D'). The temporary ectopic expression of *UAS-dome^{DN}* or *UAS-hop^{RNAi}* alone does not perturb the vein/intervein pattern (Fig. S4C–C' and E–E'). These results suggest that the autonomous activation of JAK/STAT in *hep^{CA}*-expressing cells is required for inducing the loss of cell fate commitment observed in pro-vein L3.

Next we explored whether the co-activation of JNK and JAK/STAT signalling pathways could enhance these effects. To that end, we temporary co-overexpressed an activated form of *hop* (*UAS-hop^{Tum-l}*) and *UAS-hep^{CA}* for 24 hs under the control of *en-Gal4*. We found that in all the discs examined (n = 26) the co-activation of both pathways in the posterior compartment totally eliminated the expression of Ara in the cells of pro-veins L5 and L3 (Fig. 3E–E'' and F). Strikingly, we observed that in these discs the expression of Kni in the cells of pro-vein L2 was also reduced (Fig. 3E–E'). Accordingly, we found that in these discs the expression of Bs was strongly reduced in the intervein cells of the posterior compartment and in a large region of the anterior compartment (Fig. S4F–F'). In discs over-expressing *UAS-hop^{Tum-l}* alone the expression of Ara and Bs was identical to that found in control wild type discs (Fig. S4).

The *decapentaplegic* (*dpp*) signalling pathway plays a fundamental role in patterning the wing discs along the anterior posterior axis (De Celis, 2003). JNK regulates the activity of this pathway (Perez-Garijo et al., 2009), therefore, it is possible that the effects on vein patterning

observed upon JNK activation might be due to the alteration of *dpp* activity. However, different observations and our results, suggest that the fate changes caused by JNK signalling are not due to the alteration on the activity of *dpp* signalling. Firstly, it has been shown that in late third instar (older than 105 after egg lay), vein/intervein pattern could be maintained independently of *dpp* signalling (Repiso et al., 2013). Our experiment were always performed at 132 ± 12 hs AEL, therefore when the function of this signal was not required for vein patterning. Moreover, we have analysed using our experimental condition the activity of *dpp* signalling pathways in discs over-expressing *UAS-hep^{CA}*. We examined the expression of pMad, and Spalt major (Salm) as a readout to assess the activity of Dpp signalling activity. We found that the range of expression of these factors and their levels of expression in the anterior compartment are similar in discs expressing *UAS-hep^{CA}* and control discs. The average range of cells expressing Salm and pMad at the a/p boundary in the anterior compartment is 11,8 ± 1,1 and 7,8 ± 1,03 rows of cells, respectively in control discs (n = 10) vs 10,9 ± 0,9 rows of cells for Salm and 8 ± 0,81 for pMad in discs expressing *UAS-hep^{CA}* (n = 10) (the variance represents the Standard deviation) (Fig. 4). In *en-Gal4 UAS-hep^{CA}* discs the expression of pMad in the posterior compartment is not restricted only to the central region of the wing blade, as in controls, and expand to most of the cells of this compartment (Fig. 4). This is likely as consequences of the ectopic expression of *dpp* that is induced in JNK-activating cells (Perez-Garijo et al., 2009). Finally, we have over-expressed *UAS-hep^{CA}* using *apterous-Gal4*. This Gal4 line drives the expression of Gal4 in the cells of the dorsal compartment. As previously described for *en-Gal4*, temporary activation of JNK under the control of *ap-Gal4* down-regulates the expression of Ara in pro-vein L3 and L5, in the dorsal compartment and also in the ventral compartment. This effect is partially suppressed in *ap-Gal4 UAS-GFP UAS-dome^{DN}; Tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA}* discs and it is enhanced when JAK/STAT signalling is ectopically activated in *UAS-hop^{Tum-l} UAS-hep^{CA}* (Fig. 5 and Fig. S3).

Collectively our data suggest that the cooperative function of JAK/STAT and JNK signalling is necessary to promote the loss of fate commitment non-autonomously.

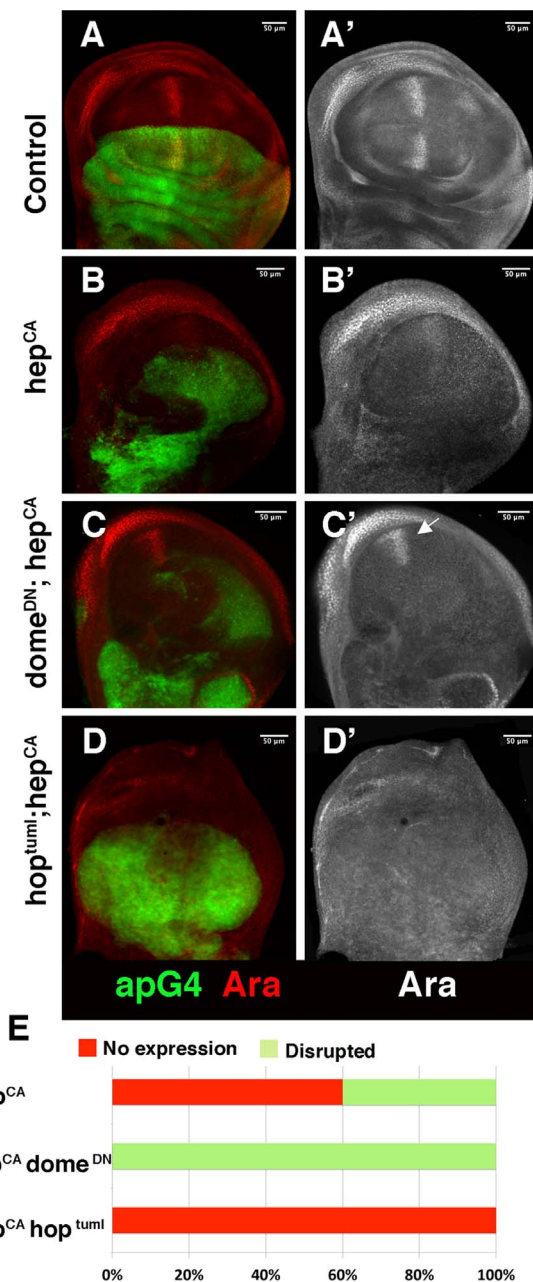


Fig. 5. The ectopic activation of JNK signalling under the control of *apterous*-Gal4 induces both autonomous and non-autonomous changes in the expression of markers of cell fate commitment. (A-D') Third instar wing discs stained with anti-Araucan (Ara) (red in A-D, and grey in A'-D'). (A-A') Control *ap-Gal4 UAS-GFP/Cyo; Tub-Gal80^{TS} /TM6* wing discs. (B-B') *ap-Gal4 UAS-GFP/+; Tub-Gal80^{TS} /UAS-hep^{CA}* discs. The expression of Ara in the cells of the pro-veins L3 and L5 is down-regulated in the dorsal compartment as well as in ventral compartment. (C-C') The ectopic expression of *UAS-dome^{DN}* and *UAS-hep^{CA}* in the dorsal compartment in *ap-Gal4 UAS-GFP/ UAS-dome^{DN}; Tub-Gal80^{TS} /UAS-hep^{CA}* discs partially restores the levels of Ara in the cells of ventral compartment (see arrow in C'). (D-D') In *ap-Gal4 UAS-GFP/ UAS-hop^{tum1}; UAS-hep^{CA} /Tub-Gal80^{TS}* discs, the expression of Ara in the pro-vein cells is eliminated in both the dorsal and ventral compartments. (E) Bar chart shows the percentage of discs in which the expression of Ara in pro-vein L3 is affected. See the detailed statistical analysis in Fig. S3.

3.4. JNK signalling regulates cell fate specification through a non-apoptotic function of the pathway

The activation of JNK signalling promotes several cellular processes, one of which is to trigger apoptosis. It has been shown that apoptotic cells can induce different signals that affect several cellular

processes in surrounding tissues (Perez-Garijo and Steller, 2015). Therefore, it is possible that the changes in cell fate commitment caused by the activation of JNK might be due to the induction of cell death. Recently, it has been shown that down-regulation of JAK/STAT signalling affects the viability of JNK-expressing cells (La Fortezza et al., 2016). We have confirmed these results, as we find that in our experimental conditions Caspase activation increases when the function of JAK/STAT is impaired in JNK-expressing cells and is dramatically reduced when *hop^{tum1}* is combined with *UAS-hep^{CA}*, as assayed with anti-Dcp1 (Figs. S6 and S7). We previously described that in this latter mutant condition there is a strong induction of cell fate re-specification throughout the disc (Figs. 3, 5 and Fig. S4). This result indicates that JNK activity is able to induce cell fates changes, autonomously as well as non-autonomously, even in condition in which cell death is reduced. Therefore, this suggests that JNK signalling might be at least partially regulating cell fate specification through a non-apoptotic function of the pathway.

To further examine this idea, we examined the effects of co-expressing *UAS-hep^{CA}* and *UAS-RHG microRNA* (miRNA). This transgene generates miRNAs that simultaneously inhibit the function of the pro-apoptotic genes *reaper*, *hid*, and *grim* (Siegrist et al., 2010). Cell death is totally suppressed in discs co-expressing *UAS-hep^{CA}* and *UAS-RHG* for 24 hs under the control of *en-Gal4* (compare Fig. 6A-A' with Fig. S6C-C'). However, we still find that in these discs the expression of Ara in pro-veins L5 and L3 was altered, although the effects on the anterior compartment were slightly weaker than those observed in discs over-expressing only *UAS-hep^{CA}* (Fig. 6D-D' and G, and Fig. S3). These results suggest that JNK signalling induces loss of cell fate specification by a mechanism that is partially apoptosis-independent. Supporting this hypothesis we found that the transient over-expression of *UAS-rpr* under the control of *en-Gal4* during 24 hs, although was sufficient to induce massive cell death (Fig. 6E-E'), did not affect the vein/intervein pattern defined by the expression of Ara and *kni* in the anterior compartment. We only observed that the expression of Ara in the pro-vein L5 in the posterior compartment disappears (Fig. 6F-F'). This result seems contradictory with the observation that the induction of cell death promotes the activation of JNK (Shlevkov and Morata, 2012). We have analysed whether the ectopic expression of *UAS-rpr* under the control of *en-Gal4* for 24hs was sufficient to induce the activity of JNK signalling. To this end we examined the expression of *puc-Lac-Z* reporter in *en-Gal4 Tub-Gal80^{TS} UAS-rpr puc-Lac-Z* discs. We find that in these discs *puc-LacZ* is ectopically activated in some cells of the posterior compartment (Fig. S8). However, compared to discs expressing *UAS-hep^{CA}*, in which *puc-LacZ* is expressed in most of the cells of the posterior compartment (Figs. S8 and S9), in *rpr*-expressing discs the number of cells expressing the reporter is much lower (Fig. S8). Thus, the ectopic expression of *UAS-rpr* in our experimental condition (24 hs of cell death induction) might not be sufficient for generating enough number of JNK signalling cells for inducing the loss of cell fate commitment, although other explanations are possible (see discussion).

Altogether our results support a model in which JNK signalling exerts at least part of its function inducing cell fate changes by a mechanism that is apoptosis-independent.

It has been shown that in some experimental conditions the activation of JNK can drive its own activation non-autonomously in surrounding cells (Perez-Garijo and Steller, 2015). Therefore, a possible mechanism to explain the non-autonomous effects that we have observed upon ectopic expression of *UAS-hep^{CA}* in the posterior/dorsal compartments might be that JNK signalling was ectopically activated in some cells of the anterior/ventral compartments by the adjacent *hep^{CA}*-expressing cells. In this context JNK signalling would be required to promote cell fate changes in both compartments. To study this possibility we have examined the activity of *puc-Lac-Z*, after the ectopic over-expression of *UAS-hep^{CA}* for 24 hs under the control of *en-Gal4*. We found that in all discs analysed (n = 10) the expression of the

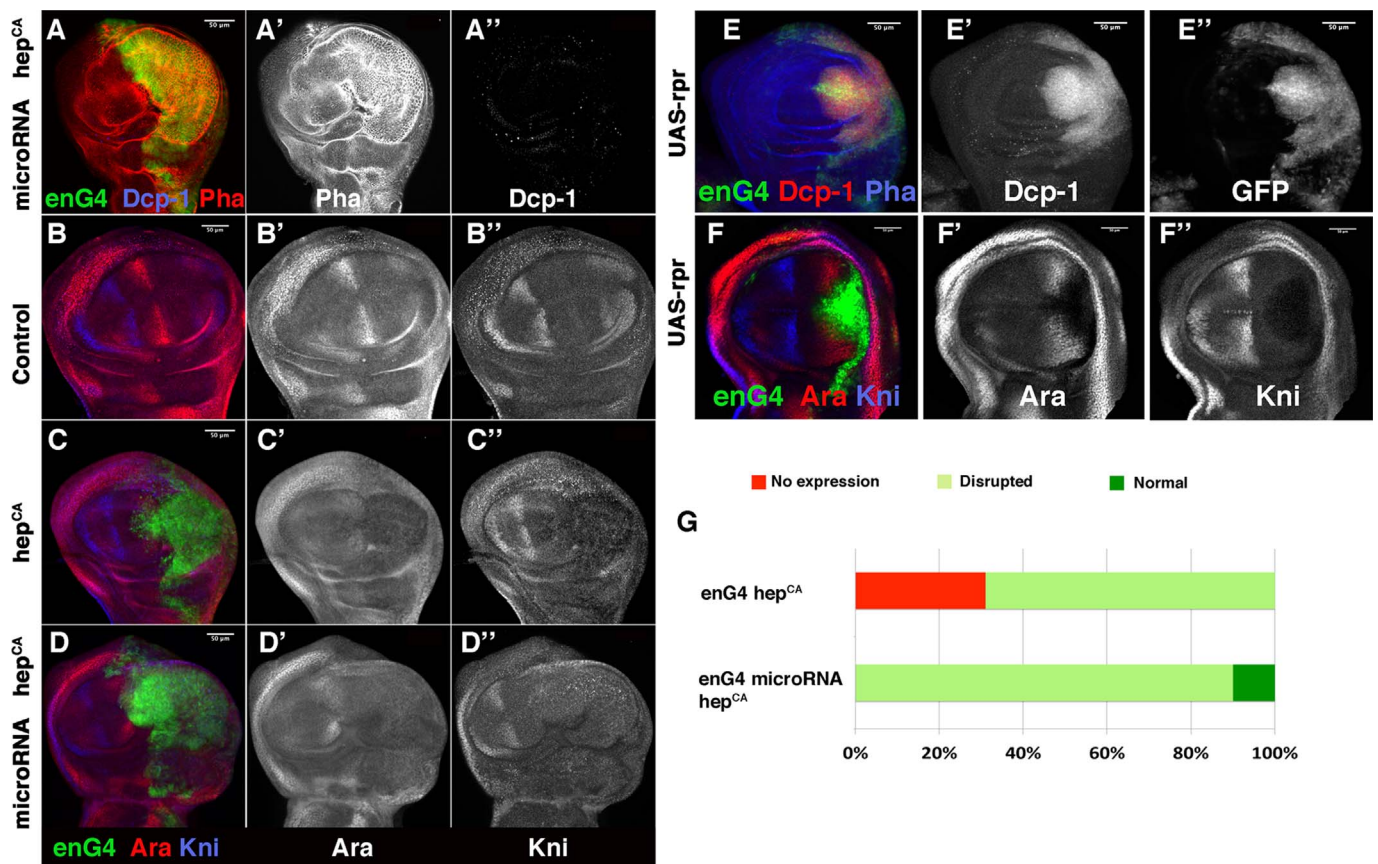


Fig. 6. -The ectopic activation of JNK promotes the loss of markers of cell fate commitment partially independent of its apoptotic function. (A-A'') Third instar *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-RHG microRNA; UAS-hep^{CA}/Tub-Gal80^{TS}* wing discs stained for anti-cleaved Dcp1 (blue in A, and grey in A'') and Phalloidin (red in A, and grey in A'). The expression of *UAS-RHG microRNA* in *UAS-hep^{CA}*-expressing cells prevents the induction of apoptosis caused by the activation of JNK signalling (compared with Figs. S6 and S7). (B-D and F) Third instar imaginal wing discs stained with anti-Araucan (red in B-D and F, and grey in B'-D' and F'') and anti-Knirps (blue in B-D and F, and grey in B'-D', and F''). (B-B'') Control wing discs. (C-C'') In *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-GFP; UAS-hep^{CA}/Tub-Gal80^{TS}* discs the expression of Ara in the cells of the pro-vein L3 is strongly down-regulated. (D-D'') In *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-RHG microRNA; UAS-hep^{CA}/Tub-Gal80^{TS}* discs, even though cell death is blocked, we still observed changes in the expression of Ara in pro-vein L3. (E-E'') The over-expression of *UAS-rpr* during 24 hs under the control of *en-Gal4* causes massive cell death in the posterior compartment. The disc is stained for anti-cleaved Dcp1 (red in E and grey in E''), and with Phalloidin (blue). (F-F'') After 24hs of over-expression of *UAS-rpr* in *UAS-rpr; en-Gal4 UAS-GFP; Tub-Gal80^{TS}* discs, the expression of Ara in the cells of the pro-vein L3 in the anterior compartment is not affected (F''). (G) Bar chart shows the percentage of discs in which the expression of Ara in pro-vein L3 is affected. See the detailed statistical analysis in Fig. S3.

reporter is autonomously restricted to the *hep^{CA}*-expressing cells in the posterior compartment (Fig. S9). We have obtained similar results analysing the activity of TRE-DsRed. This reporter faithfully reproduces all known patterns of JNK activity (Chatterjee and Bohmann, 2012). In discs over-expressing *UAS-hep^{CA}* the activity of *TRE-DsRed* is mostly restricted to the cells of the posterior compartment, and we only observe few isolated cells expressing *TRE-DsRed* in the anterior compartment (Fig. S10).

These results suggest that the non-autonomous loss of markers of cell fate commitment is not caused by the activation of JNK signalling in the cells of the anterior compartment.

3.5. The non-autonomous loss of markers of cell fate commitment caused by the over-expression of JNK signalling depends on *dronc* function

The initiator caspase *Dronc* mediates the apoptotic function of JNK signalling (Igaki, 2009; Ryoo et al., 2004; Shlevkov and Morata, 2012). In addition to trigger apoptosis this factor participates in several non-apoptotic processes (Huh et al., 2004; Ouyang et al., 2011). Interestingly, it has been proposed that *Dronc* stimulates compensatory proliferation non-autonomously, therefore it is possible that this factor may function to regulate other processes non-autonomously (Huh et al., 2004). To investigate whether *dronc* contributes to the cell fate changes induced by JNK, we expressed *UAS-hep^{CA}* in animals

mutant for *dronc*. To this end, we have over-expressed *UAS-hep^{CA}* for 24 hs under the control of *hh-GAL4* in mutant flies for the heteroallelic combination *droncⁱ²⁹/droncⁱ²⁴*. We confirmed that in this mutant combination the JNK-induced apoptosis is reduced, although we still found multiple dying cells, as assayed with anti-Dcp1 (Fig. S11). We found that in none of the *UAS-hep^{CA} UAS-GFP Tub-Gal80^{TS}; hh-GAL4 droncⁱ²⁹/droncⁱ²⁴* discs analysed (n = 20) the expression of Ara in the cells of the pro-vein L3 was altered (Fig. 7B-B''). In the posterior compartment the expression of Ara in pro-vein L5 was absent. These data imply that the non-autonomous effects of JNK signalling in inducing loss of markers of cell fate commitment depend on *Dronc*.

The activation of JNK signalling promotes the expression of *Upd* cytokines (Pastor-Pareja et al., 2008; Santabarbara-Ruiz et al., 2015; La Fortezza et al., 2016). A possible mechanism to explain the suppression of the effects caused by the over-expression of *UAS-hep^{CA}* in the *dronc* mutant condition is that *Dronc* might be necessary to promote the expression of *upd* upon JNK activation. To test this possibility, we have examined the levels of *upd* ligands in *dronc* mutant discs upon the ectopic activation of JNK signalling using a qPCR assay. We found that in *UAS-GFP UAS-hep^{CA} Tub-Gal80^{TS}/+; hh-Gal4 droncⁱ²⁹/droncⁱ²⁴* discs the levels of *upd* ligands are even higher than those observed in discs only over-expressing *UAS-hep^{CA}* (Fig. 7C). Therefore, the suppression of the effects caused by the ectopic expression of *UAS-hep^{CA}* in *dronc* mutant background are not due to the inability of JNK signalling to activate JAK/STAT in *dronc* mutant condition.

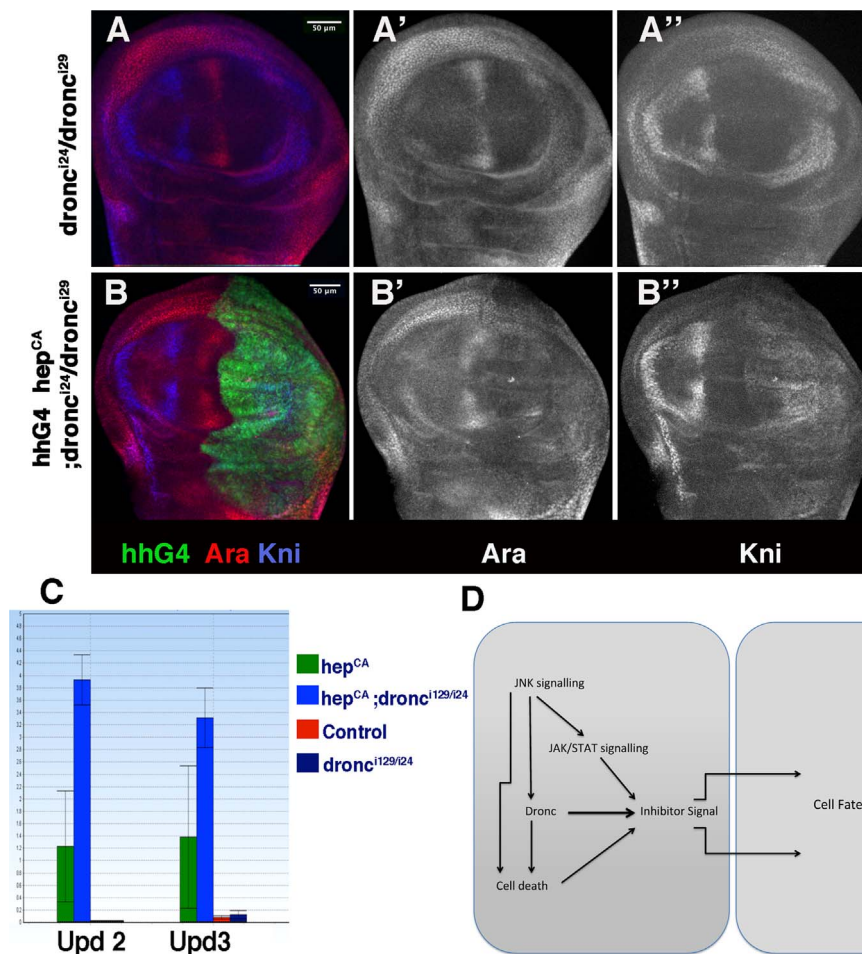


Fig. 7. The non-autonomous down-regulation of vein markers induced by the ectopic activation of JNK depends on Dronc. (A-B'') Third instar imaginal wing discs stained with anti-Araucan (red in A-B, and grey in A'-B'') and anti-Knirps (blue in A-B, and grey in A''-B''). (A-A'') In Control *droncⁱ²⁹/droncⁱ²⁴* discs the expression of vein markers is not affected. (B-B'') We observed that in *UAS-GFP Tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA} /Cyo; hh-Gal4 droncⁱ²⁹/droncⁱ²⁴* discs the expression of Araucan in the cells of the pro-vein L5 in the posterior compartment is eliminated, but in the cells of the pro-vein L3 in the anterior compartment is comparable to control discs. Compared with *Tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA}; UAS-GFP / hh-Gal4* discs (see also Fig. 3B'). Knirps expression is as in controls (A''). (C) qRT-PCR analysis of upd2 and upd3 transcripts after the ectopic expression of *UAS-hep^{CA}* during 24 hs in *Tub-Gal80^{TS} UAS-hep^{CA}; hh-Gal4/ UAS-GFP* discs (green) and *UAS-GFP UAS-hep^{CA} Tub-Gal80^{TS} /+; hh-Gal4 droncⁱ²⁹/droncⁱ²⁴* discs (blue). The levels of expression of these ligands are much higher in these conditions than in control disc (red), and *droncⁱ²⁴/droncⁱ²⁴* discs (dark blue). Fold induction relative to control discs (red). Graphs display mean \pm s.e.m. for $n = 3$ biological replicates. (D) Model proposed of synergistic function between JNK, Dronc and JAK/STAT signalling to induce cell fate changes.

4. Discussion

4.1. JAK/STAT is locally activated during Wing disc regeneration

The ectopic activation of JNK signalling is sufficient to promote JAK/STAT function in the wing discs (La Fortezza et al., 2016; Pastor-Pareja et al., 2008). However, here we have shown that in regenerating wing discs JAK/STAT signalling is present only in certain cells in the proximal region of the discs, even though JNK signalling is active in most of the cells of the wing pouch. This could be caused either by the existence of inhibitory signals that during regeneration restrict the domain where JAK/STAT signalling can be activated, or because the transient activation of JNK signalling in regenerating discs is not strong enough to induce JAK/STAT. It is also possible that both mechanisms co-exist. During normal development of the wing disc, multiple signals restrict JAK/STAT signalling activity through the repression of its activating ligand (Upd) and its activated signal transducer (Ayala-Camargo et al., 2013). This process is necessary for normal wing development, as ectopic activation of JAK/STAT signalling in the pouch is deleterious (Ayala-Camargo et al., 2013). Therefore, strict control of JAK/STAT signalling might be essential not only during normal development, but also for a correct regeneration process. In other developmental contexts, such as during leg discs

regeneration, where the inhibitory signals that operate in the proximal region of the wing disc do not exist, the Upd ligands are up-regulated only in the early phase of regeneration and fade rapidly after wounding (Katsuyama et al., 2015). Therefore, considering our data and other works previously reported, we propose that during regeneration JAK/STAT signalling is under tight spatial and temporal regulation and is only activated in some of the JNK-expressing cells.

4.2. JNK and JAK/STAT signalling cooperate to non-autonomously repress the expression of cell fate commitment markers

Our work identifies a previously unrecognised function for cooperative JNK and JAK/STAT signalling in regulating cell fate commitment. We have found that ectopic activation of JNK signalling is sufficient to induce the loss of cell fate commitment markers, autonomously, as well as non-autonomously in surrounding non JNK-expressing cells. This non-autonomous effect suggests that the ectopic activation of JNK signalling generates an inhibitory signal/s that can induce cell fate commitment changes in adjacent cells. Our data indicate that the production of this signal/s depends on the function of JAK/STAT signalling.

It has been shown that the JAK/STAT pathway functions downstream of JNK signalling (La Fortezza et al., 2016; Katsuyama et al.,

2015), nevertheless our data indicate, that in contrast to JNK signalling, the transient ectopic activation of JAK/STAT signalling is not sufficient to induce any changes in the expression of patterning genes. These data imply that the JAK/STAT pathway is not the only mechanism through which JNK signalling alters cell fate specification. Therefore, in parallel to JAK/STAT pathway, JNK signalling must induce other signal/s that in combination with JAK/STAT would induce the fate changes caused by the activation of JNK pathway. Interestingly, the intensity of the effects produced by JNK-activated cells increase when JAK/STAT is also activated. This synergistic interaction supports the idea that autonomous induction of the signal/s that regulate cell fate commitment requires cooperative parallel inputs for both signalling pathways (Fig. 7D). Another interesting aspect of the inhibitory signal/s produced by the activation of JNK signalling is that its range of action expands. Thus, the effects caused by the ectopic activation of JNK signalling alone are restricted to the cells immediately adjacent to the JNK-activating cells, even though in these cells the endogenous JAK/STAT signalling is also activated. However, when both pathways are ectopically co-activated at high levels, the cell fate commitment of most of the cells of the anterior compartment are distorted. These observations suggest that the inhibitory signals generated by the co-activation of JAK/STAT and JNK signalling function in a graded manner.

As previously mentioned our results suggest that JNK signalling in parallel to JAK/STAT activates other signal/s that are necessary for inducing the non-autonomously loss of markers of cell fate commitment. Our data suggest that this signal is at least partially independent of the apoptotic function of JNK signalling. We have found that the elimination of Dronc suppress the non-autonomous effects caused by the ectopic activation of JNK signalling. The function of Dronc is activated by JNK signalling (Shlevkov and Morata, 2012). These results are consistent with a function of Dronc mediating the induction of the non-autonomous signal generated by the ectopic activation of JNK signalling. Interestingly, it has been shown that Dronc provides a compensatory proliferation signal to neighbours in different contexts (Huh et al., 2004). Since we have shown that the suppression of apoptosis after the ectopic activation of JNK was not sufficient to completely block the loss of cell fate markers, we proposed that in this context *dronc* provides a signal involved in inducing cell fate re-specification through a non-apoptotic mechanism (Fig. 7D).

It has been previously reported that the induction of apoptosis through the activation of *rpr* promotes the function of JNK signalling (Shlevkov and Morata, 2012). We have found similar results using our experimental condition (Fig. S8). However, we have shown that to difference to the ectopic activation of *UAS-hep^{CA}*, the over-expression of *UAS-rpr* does not alter the expression of Ara in the anterior compartment. We have suggested that these contradictory results might be explained by our observation that the number of JNK signalling cells induced by the ectopic expression of *UAS-rpr* for 24 hs, is smaller than the number JNK signalling cells generated when *UAS-hep^{CA}* is overexpressed. Alternatively, it is also possible that the activation of JNK signalling through the expression of *UAS-hep^{CA}* might directly act over the target genes involved in generating the signals required in changing cell fate, whereas the induction of cell death through *UAS-rpr* would activate JNK signalling, that in turn would induce cell fate changes. In this scenario, the time for promoting cell fate changes would be longer when *UAS-rpr* is over-expressed than when JNK is activated. Supporting this hypothesis, we found that after 48 hs of over-expressing *UAS-rpr*, the expression of Ara is always eliminated (n = 10) in the anterior compartment of the discs analysed (Fig. S12). These data indicate that the time required for promoting cell fate changes after the induction of *UAS-rpr* is longer than the time necessary when *UAS-hep^{CA}* is ectopically activated. This result suggests that the signal/s for inducing cell fate changes are activated faster after the ectopic activation of *UAS-hep^{CA}* than with *UAS-rpr*. However, this experiment does not rule out that the levels of JNK activation after 24

hs of *UAS-rpr* overexpression are not strong enough for inducing cell fate changes, either because the number of JNK signalling cells is not enough, as we mentioned before, or because the signal levels of JNK in this condition are too low.

The ectopic activation of JNK signalling promotes the expression of Wingless and Dpp (Fig. S6) (Perez-Garijo et al., 2009). The functions of these factors play a fundamental role in regulating patterning and proliferation during wing disc development. This raised the possibility that Dpp and Wg may be mediating the patterning defects observed after JNK activation. However, we have observed that in *en-Gal4 UAS-hep^{CA}* *dronc* discs, even though these two factors are ectopically expressed (Perez-Garijo et al., 2009) (Fig. S11) the patterning defects are corrected. In addition, we have shown that the ectopic activation of JNK signalling can produce changes in cell fate specification without affecting *dpp* signalling activity. All together these data imply that the cell fate changes induced by the ectopic activation of JNK signalling are not due to the up-regulation of Wg and Dpp.

Collectively our results lead us to propose that during regeneration the local combined action of JAK/STAT and JNK signalling promotes a signal/s that regulate the fate commitment state of surrounding cells. Changes in the fate state of the cells is likely associated with a re-patterning process that occurs in early stages of regeneration. The signal/s generated in cells where JAK/STAT and JNK signalling are activated also regulates regenerative growth.

5. Conclusion

Our results suggest a cooperative function between JNK and JAK/STAT signalling in the induction of loss of cell fate specification during regeneration. We show that the Caspase initiator Dronc is necessary to promote this function in response to the activation of JNK signalling. The data reported here provide important insights into the mechanisms through which the activities of JNK and JAK/STAT signalling pathways can regulate cell fate decisions in response to tissue damage.

Acknowledgements

We thank Jose Felix de Celis, and Carlos Estella for providing reagents and useful discussion. Carlos Estella, Scott Lindsay, Luis Alberto Baena and Raquel Martin for helping to improve the manuscript. We are very grateful to Gines Morata, Marco Milan, Hermann Steller, Sosonsoles Campuzano, the Bloomington Stock Center and the Developmental Studies Hybridoma Bank for providing fly strains and antibodies. This work was supported by a grant obtained from the MEC (BFU2014-54153-P) and Fundación Ramón Areces. SDG was supported by an FPI fellowship from the MICINN.

Conflict of interest

We declare that no competing interest exist.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ydbio.2018.05.021.

References

- Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y., Matsumoto, K., 1999. Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* 400, 166–169.
- Aldaz, S., Escudero, L.M., Freeman, M., 2010. Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 14217–14222.
- Arbouzova, N.I., Zeidler, M.P., 2006. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 133, 2605–2616.
- Ayala-Camargo, A., Anderson, A.M., Amoyel, M., Rodrigues, A.B., Flaherty, M.S., et al., 2013. JAK/STAT signaling is required for hinge growth and patterning in the *Drosophila* wing disc. *Dev. Biol.* 382, 413–426.

- Bach, E.A., Ekas, L.A., Ayala-Camargo, A., Flaherty, M.S., Lee, H., et al., 2007. GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expr. Patterns* 7, 323–331.
- Bergantinos, C., Corominas, M., Serras, F., 2010a. Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development* 137, 1169–1179.
- Bergantinos, C., Vilana, X., Corominas, M., Serras, F., 2010b. Imaginal discs: renaissance of a model for regenerative biology. *Bioessays* 32, 207–217.
- Bogoyevitch, M.A., Ngoei, K.R., Zhao, T.T., Yeap, Y.Y., Ng, D.C., 2010. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys. Acta* 1804, 463–475.
- Bosch, M., Baguna, J., Serras, F., 2008. Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 1043–1050.
- Bosch, M., Serras, F., Martin-Blanco, E., Baguna, J., 2005. JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev. Biol.* 280, 73–86.
- Brookes, J.P., Kumar, A., 2008. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 525–549.
- Bryant, P.J., 1971. Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 26, 637–651.
- Bryant, P.J., 1975. Pattern formation in the wing imaginal disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication. *J. Exp. Zool.* 193, 49–78.
- Chatterjee, N., Bohmann, D., 2012. A Versatile ϕ C31 based reporter system for measuring AP1 and Nrf2 signaling in *Drosophila* and in tissue culture. *PLoS One* 7, e34063.
- Chen, F., 2012. JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer Res.* 72, 379–386.
- De Celis, J.F., 2003. Pattern formation in the *Drosophila* wing: the development of the veins. *Bioessays* 25, 443–451.
- Diaz-Garcia, S., Baonza, A., 2013. Pattern reorganization occurs independently of cell division during *Drosophila* wing disc regeneration in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 13032–13037.
- Hadorn, E., Buck, D., 1962. Ueber Entwicklungsleistungen transplantierter teilstücke von Flügel-Imaginalschiben von *Drosophila melanogaster*. *Rev. Suisse Zool.* 69, 302–310.
- Harris, R.E., Setiawan, L., Saul, J., Hariharan, I.K., 2016. Localized epigenetic silencing of a damage-activated WNT enhancer limits regeneration in mature *Drosophila* imaginal discs. *Elife*, 5.
- Harrison, D.A., Binari, R., Nahreini, T.S., Gilman, M., Perrimon, N., 1995. Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.* 14, 2857–2865.
- Herrera, S.C., Morata, G., 2014. Transgressions of compartment boundaries and cell reprogramming during regeneration in *Drosophila*. *Elife* 3, e01831.
- Huh, J.R., Guo, M., Hay, B.A., 2004. Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr. Biol.* 14, 1262–1266.
- Igaki, T., 2009. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis* 14, 1021–1028.
- Katsuyama, T., Comoglio, F., Seimiya, M., Cabuy, E., Paro, R., 2015. During *Drosophila* disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell proliferation with Dilp8-mediated developmental delay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E2327–E2336.
- La Fortezza, M., Schenk, M., Cosolo, A., Kolybaba, A., Grass, I., et al., 2016. JAK/STAT signalling mediates cell survival in response to tissue stress. *Development* 143, 2907–2919.
- Lee, N., Maurice, C., Ringrose, L., Paro, R., 2005. Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* 438, 234–237.
- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., et al., 1998. puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12, 557–570.
- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., et al., 1998. puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12, 557–570.
- Mattila, J., Omelyanchuk, L., Kytälä, S., Turunen, H., Nokkala, S., 2005. Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 391–399.
- Morata, G., Herrera, S.C., 2016. Cell reprogramming during regeneration in *Drosophila*: transgression of compartment boundaries. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 40, 11–16.
- Ouyang, Y., Petritsch, C., Wen, H., Jan, L., Jan, Y.N., et al., 2011. Dronc caspase exerts a non-apoptotic function to restrain phospho-Numb-induced ectopic neuroblast formation in *Drosophila*. *Development* 138, 2185–2196.
- Pastor-Pareja, J.C., Wu, M., Xu, T., 2008. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis. Model Mech.* 1, 144–154, (discussion 153).
- Perez-Garijo, A., Shlevkov, E., Morata, G., 2009. The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development* 136, 1169–1177.
- Perez-Garijo, A., Steller, H., 2015. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development* 142, 3253–3262.
- Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D., Manfrulli, P., 2002. JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 241, 145–156.
- Repiso, A., Bergantinos, C., Serras, F., 2013. Cell fate respecification and cell division orientation drive intercalary regeneration in *Drosophila* wing discs. *Development* 140, 3541–3551.
- Roch, F., Baonza, A., Martin-Blanco, E., Garcia-Bellido, A., 1998. Genetic interactions and cell behaviour in blistered mutants during proliferation and differentiation of the *Drosophila* wing. *Development* 125, 1823–1832.
- Ryoo, H.D., Gorenc, T., Steller, H., 2004. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev. Cell* 7, 491–501.
- Santabarbara-Ruiz, P., Lopez-Santillan, M., Martinez-Rodriguez, I., Binagui-Casas, A., Perez, L., et al., 2015. ROS-induced JNK and p38 signaling is required for unpaired cytokine activation during *drosophila* regeneration. *PLoS Genet* 11, (e1005595).
- Schubiger, G., 1971. Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 26, 277–295.
- Shlevkov, E., Morata, G., 2012. A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 19, 451–460.
- Siegrist, S.E., Haque, N.S., Chen, C.H., Hay, B.A., Hariharan, I.K., 2010. Inactivation of both Foxo and reaper promotes long-term adult neurogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 20, 643–648.
- Smith-Bolton, R.K., Worley, M.I., Kanda, H., Hariharan, I.K., 2009. Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. *Dev. Cell* 16, 797–809.
- Sotillos, S., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Castelli-Gair Hombria, J., 2008. Polarized subcellular localization of Jak/STAT components is required for efficient signaling. *Curr. Biol.* 18, 624–629.
- Sun, G., Irvine, K.D., 2014. Control of growth during regeneration. *Curr. Top. Dev. Biol.* 108, 95–120.
- Tanaka, E.M., Reddien, P.W., 2011. The cellular basis for animal regeneration. *Dev. Cell* 21, 172–185.
- Worley, M.I., Setiawan, L., Hariharan, I.K., 2012. Regeneration and transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Annu. Rev. Genet.* 46, 289–310.
- Xu, D., Li, Y., Arcaro, M., Lackey, M., Bergmann, A., 2005. The CARD-carrying caspase Dronc is essential for most, but not all, developmental cell death in *Drosophila*. *Development* 132, 2125–2134.

Review Article

Drosophila as a Model System to Study Cell Signaling in Organ Regeneration

Sara Ahmed-de-Prado and Antonio Baonza 

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC/UAM, 28049 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Antonio Baonza; abaonza@cbm.csic.es

Received 23 November 2017; Accepted 6 February 2018; Published 19 March 2018

Academic Editor: Ruijin Huang

Copyright © 2018 Sara Ahmed-de-Prado and Antonio Baonza. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Regeneration is a fascinating phenomenon that allows organisms to replace or repair damaged organs or tissues. This ability occurs to varying extents among metazoans. The rebuilding of the damaged structure depends on regenerative proliferation that must be accompanied by proper cell fate respecification and patterning. These cellular processes are regulated by the action of different signaling pathways that are activated in response to the damage. The imaginal discs of *Drosophila melanogaster* have the ability to regenerate and have been extensively used as a model system to study regeneration. *Drosophila* provides an opportunity to use powerful genetic tools to address fundamental problems about the genetic mechanisms involved in organ regeneration. Different studies in *Drosophila* have helped to elucidate the genes and signaling pathways that initiate regeneration, promote regenerative growth, and induce cell fate respecification. Here we review the signaling networks involved in regulating the variety of cellular responses that are required for discs regeneration.

1. Introduction

Regeneration is the ability that presents some organisms and allows them to partially or fully replace missing or damaged organs. This capacity is conserved among different phyla and it involves a wide range of processes, from wound healing to the induction of regenerative growth to reconstruct a whole new organ, as in urodele amphibians [1, 2]. Studying regeneration should shed light on the mechanisms that regulate this process, paving the way for their potential therapeutic applications in regenerative medicine.

Drosophila melanogaster is a powerful model system to perform genetic analysis, and it has provided much of the information of our understanding about the genetic basis of organ morphogenesis. While the adult organs of *Drosophila* are incapable of regenerating, the primordia of these structures, known as imaginal discs, can undergo regenerative growth. Imaginal discs are epithelial sac-like structures that develop from the embryonic ectoderm and after a period of cell proliferation in the larval stages, they give rise to the adult cuticle.

A series of classic experiments from the mid-1940s to the 1970s laid the groundwork for our current understanding of regeneration in *Drosophila* imaginal discs [3–5]. The classic approach used to study regeneration in *Drosophila* was to grow the regenerating discs *in vivo* culture. The disc was extracted from the larva and after amputating a fragment of it, it was transplanted into the abdomen of an adult host, where the cells of the discs could proliferate and the disc would regenerate [3, 6]. After regeneration the disc was then extracted from the adult host and examined [5, 7].

One of the problems of these studies is that regeneration did not occur under physiological conditions, since the disc regenerates in an adult host. Moreover, the process of disc extraction and transplantation will cause some stress to the cells of the discs, provoking apoptosis and halting cell proliferation in the first few hours after transplantation [8]. An alternative approach based on the transient induction of cell death in specific regions of the discs has resolved some of these problems. This method implies the use of the *Gal4/UAS* binary system in combination with *Gal80^{ts}* to express a cell-death inducer, which makes it possible to genetically ablate a

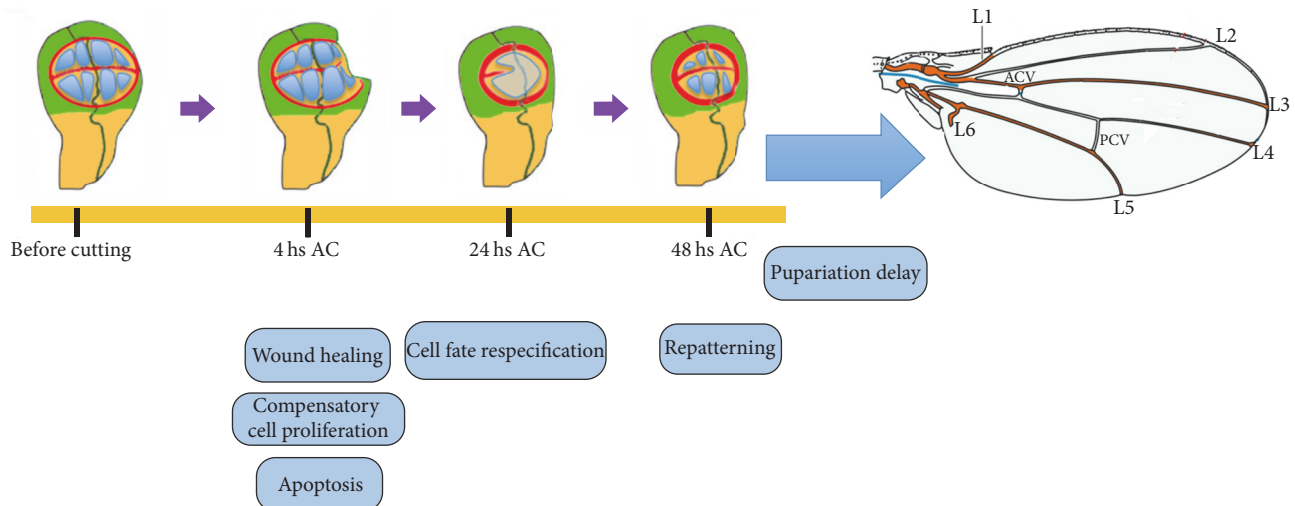


FIGURE 1: *Drosophila* wing imaginal discs regeneration process. After a cut or genetic ablation in the third instar wing imaginal discs various cellular processes occur. First, four hours after cut (AC), the wound heals restoring the epithelial continuity. Around 24 hours AC, some cells lose expression of markers of cell fate commitment. Finally, the pattern is restored and the discs give rise to a normal pattern and sized adult wings. However, there is a delay in pupariation to allow the tissue to regenerate.

region of the disc *in vivo* for a predetermined period of time, after which the disc recovers [9, 10]. Although this technique mimics some aspects of surgical amputation, there are important differences between these two approaches. For instance, unlike amputation the overexpression of a cell-death inducer may not be sufficient to eliminate all the cells in the region targeted, and thus dying cells will coexist with living cells during the period of recovery. A further method has been developed to study disc regeneration in its normal developmental context. This system consists of removing a section of the disc “in situ” inside the larvae without extracting the discs from the larvae [11, 12]. The results obtained using these different approaches revealed that the initial stages of disc regeneration involve different processes. Thus, after wound healing a zone with a high rate of cell proliferation appears at the edges of the wound, similar to the blastema that originates during limb regeneration in amphibians and teleost fish. In addition, there is a temporary loss of markers of cell fate commitment and repatterning (Figure 1) [5, 7, 10, 12, 13]. All these cellular processes are triggered and regulated by the action of different signaling pathways. In this article we will focus on the signaling networks that regulate the various cell responses required to control the early stages of imaginal disc regeneration.

2. Reactive Oxygen Species (Ros) Are Induced in Response to Disc Damage

One of the first reactions of the imaginal disc in response to damage is the production of reactive oxygen species (Ros). Ros have been increasingly implicated in the physiological regulation of many developmental processes, including the emergence of stem cells, inflammatory cell recruitment, or the differentiation of embryonic cardiomyocytes. Ros act

at many distinct levels in biological processes, affecting gene expression, protein translation, and protein-protein interactions [14–17]. Ros are the by-products of aerobic metabolism and they include superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2). There are numerous potential sources of Ros within the cells and various organelles within the cell can produce Ros. One important generator of oxidant is a family of NADPH-dependent oxidases (Nox/Duox). These transmembrane proteins regulate the generation of Ros and an increase in their activity is produced in response to different stimuli after damage, such as the liberation of Ca^{2+} . Indeed, wounding in *Drosophila* embryos provokes the binding of Ca^{2+} to Duox and its activation [18].

The specific effects of Ros are largely modulated by the reversible oxidation and reduction of reactive Cys residues, which in turn provokes the reversible modification of enzymatic activity of redox-sensitive targets, such as Tyrosine phosphatases or kinases [16, 17].

There is increasing evidence indicating that, during regeneration in vertebrates, the response to damage involves oxidative stress and, consequently, the stimulation of stress-activated protein kinases [19–21]. Ros have been also proposed to play a key role in disc regeneration [22–27]. Physical injury or genetic ablation of part of the imaginal disc provokes Ros production in cells at the wound site [22–25]. The initial burst of Ros acts as a chemoattractant for macrophages and it is necessary for the activation of different signaling pathways [22, 25, 27] (reviewed in [26]) (Figure 2). It is not clear how the first burst of Ros is generated, although different mechanisms have been identified that contribute to the increase in Ros levels in response to damage (see below). Shortly after trauma, Ros is also detected in cells adjacent to the injured region, although at a lower concentration [22].

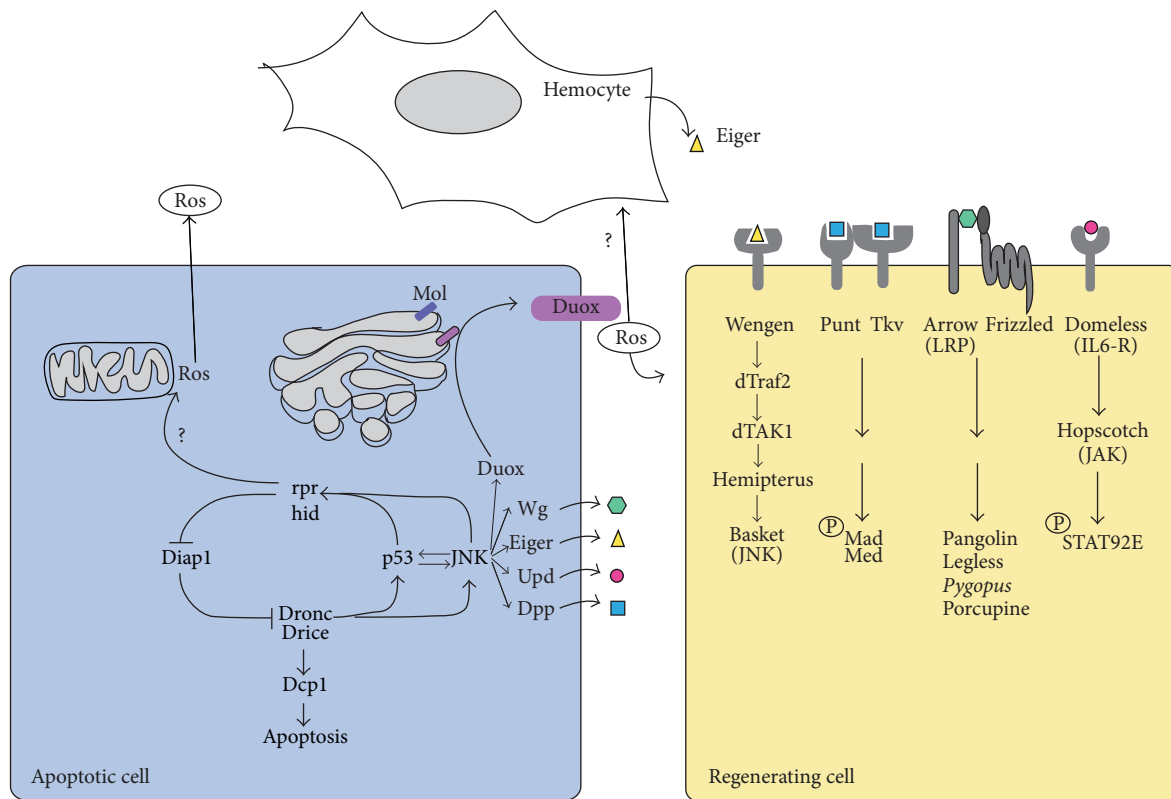


FIGURE 2: Signaling network promoting apoptosis and Ros production after discs damage. Damage causes the activation of different signals that lead to apoptosis and high levels of Ros accumulation in dying cells. The function of Duox leads to extracellular Ros production that is responsible for hemocyte recruitment and promotes the activation of different signaling pathways in surrounding cells. Hemocytes secrete Eiger, which activates JNK pathway in the adjacent cells. Apoptotic cells produce also different signals that influence surrounding cells.

3. Activation of JNK Signaling Promotes Ros Production and Triggers Multiple Responses

JNK signaling is initially triggered at the wound site in response to Ros, and probably by other cellular stress signals [28]. Ros has been proposed to regulate the activity of MAP3K (MEKK1) and apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1 or MAP3K5), kinases that reside upstream of JNK [16, 17, 29–31]. In addition, Ros can also block the function of the MAP kinase phosphatases that inhibit JNK signaling [30, 32]. JNK signaling promotes the activation of proapoptotic genes like *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*), and *grim*. The proteins encoded by these genes bind to and inhibit the activity of Drosophila IAP-1 (Diap1), which in turn blocks the initiator caspase-9 orthologue Dronc (Drosophila NEDD2-like caspase). Dronc activates the effector caspases Dcp1 and Drice (Drosophila interleukin converting enzyme), inducing apoptosis. It has been shown that *rpr* and *hid* alter cytochrome Cytochrome C in the mitochondria, leading to mitochondrial disruption [33–36]. While the origin of Ros after damage remains unclear, the action of *rpr* and *hid* on mitochondria could favor Ros production by apoptotic cells (Figure 2).

The tumor suppressor Dp53 is another factor activated by JNK signaling and that is necessary to trigger apoptosis,

playing a fundamental role in the elimination of cells that cannot complete DNA repair [37]. Both dp53 and JNK can activate each other in a Dronc-independent manner, and they establish a feedback loop that amplifies the initial apoptotic signals [38]. This loop is very important to promote cell death in response to the activation of the apoptotic pathway (Figure 2) [38]. Dp53 is required to induce compensatory proliferation and to reestablish the patterning of the damaged discs. Interestingly, it has been proposed that these functions are not dependent on apoptosis [39, 40].

JNK signaling also increases the levels of Ros by transcriptionally activating the gene *moladietz* (*mol*) [23]. This gene encodes the Duox-maturation factor NIP that is required for the production of Ros. Therefore, the activation of *mol* favors the production of Ros and it promotes a positive feedback signal that ensures the prolonged JNK activation necessary for regenerative growth (Figure 2) [23, 25]. Ros are also involved in the activation of *Cap-n-collar* (*cnc*). The transcriptional targets of *cnc* constrain Ros levels within a range in which regeneration is most efficient [24]. The cells with the highest levels of JNK signaling die and produce high levels of Ros. Indeed, at the wound edge there are apoptotic cells that have high levels of Ros in conjunction with high levels of JNK [22]. Ros propagate from dying or dead cells to the nearby surviving cells, and they activate multiple factors

and signaling pathways. Indeed, Ros can propagate from cell to cell through aquaporins [41] or gap junctions [42].

Like other signals generated by apoptotic cells, Ros can affect surrounding cells. Various studies have shown that apoptotic cells can influence the proliferation and survival of nearby surviving cells. Indeed, apoptotic cells have been proposed to send signals that induce surrounding cells to divide or to die; events are known as apoptosis-induced proliferation (AiP) or apoptosis-induced apoptosis (AiA) [43]. It has been suggested that apoptotic cells can release mitogenic factors, such as the *Drosophila* Wnt1 homologue Wingless (Wg), the bone morphogenetic protein (BMP) Decapentaplegic (Dpp), and the leptin-like (IL-6 family) cytokine ligands Unpaired proteins (Upd, Upd2, Upd3) (Figure 2) (see below). Therefore, apoptosis at the wound site might fulfill a fundamental role in regulating regenerative proliferation. However it has been shown that the partial inhibition of apoptosis does not have a major effect on disc regeneration [8, 44]. A possible explanation for this paradox might be that apoptosis was not fully suppressed in any of these analysis. Thus, the signals emitted by the few apoptotic cells that remain might be sufficient to induce proliferation of the surrounding cells. More studies will be necessary to clarify the true role of apoptotic cells during regeneration.

4. P38 and JNK Signaling Promotes JAK/STAT Activation

Ros generated during apoptosis promotes tolerable levels of JNK in nearby surviving cells. Thus, in addition to apoptotic cells at the wound site, nonapoptotic cells also appear that have nondeleterious levels of JNK and low levels of Ros [22]. Hemocytes stimulated by Ros are also involved in activating JNK in surviving cells adjacent to the wound, since hemocytes release the TNF ligand Eiger that can induce JNK signaling [25]. JNK signaling plays a key role in regulating many biological processes involved in regeneration, including wound healing, compensatory proliferation, apoptosis, and cytoskeletal rearrangement. Inhibition of JNK during disc regeneration impairs wound healing and reduces regenerative proliferation [8, 28, 45, 46]. These regenerative responses depend on the activation of several downstream pathways by JNK.

In addition to the activation of JNK signaling, Ros can regulate the P38 stress-activated MAP kinases in surviving cells. The activation of P38 signaling is independent of the JNK pathway [22] and it has been proposed that Ros may promote the P38 pathway through the oxidative modification of intracellular kinases, such as the redox-sensitive activating protein-1 ASK1 [31]. The nondeleterious activation of JNK and P38 MAP kinases by Ros may have multiple effects, among them the induction of cytokine expression [11, 22, 29, 47, 48]. *Drosophila* has three leptin-like (IL-6 family) cytokine ligands known as the Unpaired proteins (Upd, Upd2, and Upd3). After physical injury or cell death, the three *upd* genes are upregulated in the wound's edges in a manner dependent on JNK signaling [22, 47, 48]. It is unclear whether these factors are expressed exclusively in dead cells

(as we mentioned before), or they are also expressed in surviving cells surrounding the damage region. In this review we have considered that both dead and surviving cells can express these ligands. The Upd ligands bind to the IL-6R type receptor *Domeless* (*dome*), which activates the Janus kinase Hopscotch (Hop), and this phosphorylation cascade promotes the translocation of a Stat3-like transcription factor (Stat92E) to the nucleus (Figure 3). All these factors constitute the JAK/STAT signaling pathway, which has important roles in disc development, for instance appendage patterning [49–51] and the control of cell proliferation [49, 52–54]. The elimination of JAK/STAT components during leg disc regeneration impairs local cell proliferation [48]. Similarly, during wing disc regeneration, reduced JAK/STAT activity also partially disrupts adult wing recovery, leading to the generation of much smaller adults wings [22, 47]. As such, it was proposed that JAK/STAT signaling functions downstream of JNK/P38 signaling and that it is necessary to induce compensatory cell proliferation and to form the blastema (Figure 4) [48]. However, instead of promoting compensatory cell proliferation, it has been proposed that JAK/STAT might be necessary to restrain the excessive tissue damage caused by the activation of the JNK pathway, which would facilitate the initiation of compensatory responses [47]. JAK/STAT could act as a suppressor of JNK signaling and this repression could either be mediated by direct transcriptional effects on JNK components or indirectly, by suppressing apoptosis. This mechanism could restrain the nonautonomous activation of JNK and excessive apoptosis [47]. This function of JAK/STAT would be mediated by Zfh1 and Zfh2 (Zinc-finger homeobox) proteins. These ZEB proteins that act as transcriptional repressors [47] have been previously identified to be downstream effectors of JAK/STAT [47, 49, 55]. In the promoter region of *hid* as well as in the promoter of the gene *key*, which encodes for the AP-1 component cFos, appears multiple, highly clustered mammalian ZEB1-binding motifs [47]. Therefore, it has been proposed that Zfh1 and Zfh2 might be restraining JNK activation by repressing *key*. In addition, ZEB proteins might be also competing with AP-1 for transcriptional repression of *hid*, thereby limiting the apoptosis induced by JNK signaling through *hid* (Figure 3) [47].

In addition to the possible role that JAK/STAT might have in controlling cell proliferation, this pathway also induces a physiological response by activating *Drosophila insulin-like peptide* (*dilp8*) [47, 48]. This paracrine factor is activated after damage and it regulates the timing of pupariation [56, 57]. It has been reported that Dilp8 regulates both developmental delay and growth coordination between regenerating and undamaged tissue. Dilp8 inhibits the production of the neuropeptide prothoracicotropic hormone (PTTH), causing developmental delay [56, 57]. Moreover Dilp8 activates Nitric oxide synthase (NOS) in the prothoracic gland. NOS limits the growth of undamaged tissues by reducing ecdysone biosynthesis [58, 59]. The function of Dilp8 is mediated by the Orphan leucine-rich G-protein coupled receptor Lgr3. Lgr3 activity is necessary in the Central nervous system (CNS), as well as in the prothoracic gland, for NOS activation following damage [60–62].

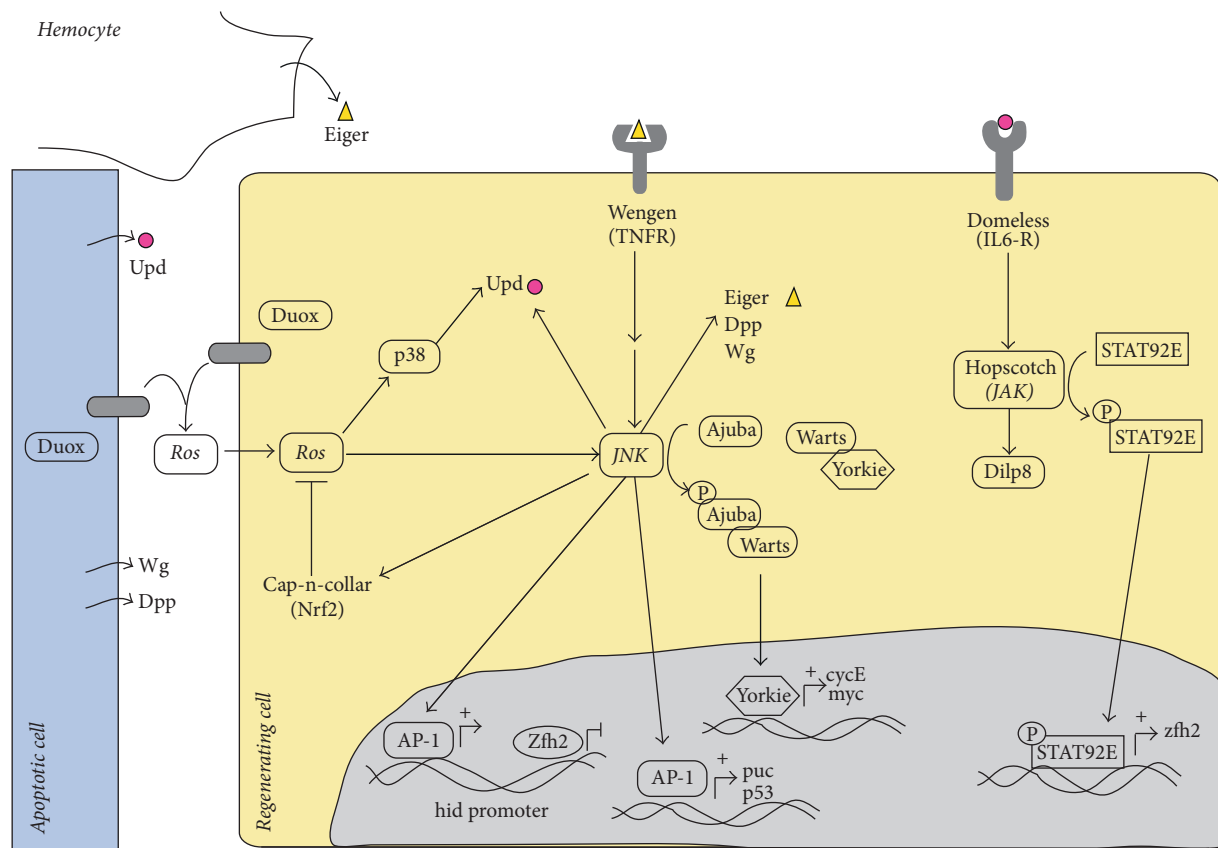


FIGURE 3: Schematic of regulatory interactions between components of signaling pathways involved in promoting *Drosophila* wing disc regeneration. See text for details.

As we mentioned the activation of *dilp8* after damage depends on the JAK/STAT pathway [47, 48]; therefore, JAK/STAT signaling might favor regeneration by delaying development [47, 48, 56, 57].

5. The Role of Wg and Dpp Signaling in Disc Regeneration

The Wingless family of proteins (Wnt class) are involved in regeneration in different organisms with this capacity [2, 63, 64]. Intriguingly, different responses to *wg* expression have been observed during disc regeneration depending upon the proapoptotic gene employed or the methods of inducing the wound. Thus, *wg* (the *Drosophila* Wnt1 homologue) is ectopically expressed near the lesion edges before blastema formation in amputated leg and eye imaginal discs [48, 65–67]. In addition, *wg* is upregulated in the wing cells that form the blastema after genetic ablation by expressing *Eiger* or the proapoptotic gene *reaper* [9]. During these processes *wg* is activated by JNK signaling [48]. Using these experimental approaches regenerative proliferation was impaired when *wg* was reduced [9, 48]. Accordingly, it was proposed that *wg* is required for regenerative proliferation (Figure 4). This effect is at least in part due to the down regulation of Notch, which leads to Myc upregulation [9]. It has also been proposed that

JAK/STAT signaling cooperates with Wg signaling to induce regenerative cell proliferation [48].

Paradoxically, when apoptosis was induced by overexpressing the proapoptotic gene *head involution defective* (*hid*) or when a portion of a disc is eliminated *in situ* [12], *wg* expression was not altered during disc regeneration [68]. Moreover, knocking down *wg* did not block discs regeneration after *in situ* amputation or *hid* expression [12, 68]. The basis for these differences in *wg* expression and its requirements are not yet clear. They might in part reflect differences in the efficiency of genetic ablation, or that different methods of inducing a wound elicit different responses in terms of gene expression. Alternatively, *wg* function might be redundant with the activity of other genes of Wnt family present in *Drosophila*, such as *wnt6*. In fact, *wnt6* and *wg* share the same regenerative enhancer (see below). Therefore, more work is needed to define the role of *wg* signaling in the regenerative response.

The bone morphogenetic protein (BMP) Decapentaplegic (*Dpp*) activates a signaling pathway that plays an important role in inducing growth and patterning during imaginal disc development [69–72]. Therefore, it was suggested that the *Dpp* pathway might be redeployed to control regenerative growth. However, the contribution of the *Dpp* signal to this process remains unclear. Thus, although *dpp* is transcriptionally activated in response to genetic ablation in wing

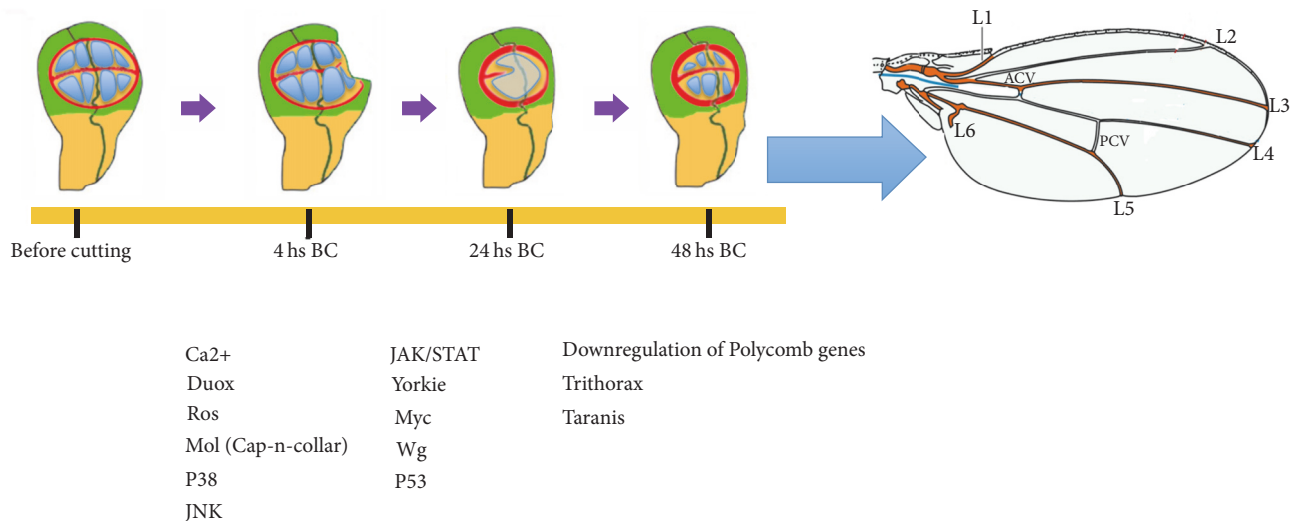


FIGURE 4: Schematic representation of the different factors and signaling pathways involved in the regulation of the cellular processes that occur during wing disc regeneration; see text for details.

discs [9], this is not the case in amputated wing discs [46]. Moreover, while Dpp is required for the hyperplastic growth caused by “undead” cells, when apoptotic cells are protected with P35 [73, 74], this factor is dispensable for compensatory cell proliferation when P35 is not ectopically expressed in apoptotic cells, even though Dpp is expressed in apoptotic cells [74, 75]. As yet, the basis for these differences remains unclear.

It has been proposed that both *wg* and *dpp* are activated in apoptotic cells and diffuse to surrounding cell to promote proliferation [73–75]. However, as JNK signaling pathway is active, although at low levels, in surviving regenerating cells [22], and *wg* and *Dpp* are targets of JNK signal, we do not exclude the possibility that these factors might be also expressed in some regenerating cells (Figure 3).

6. The Hippo Pathway Is Necessary for Regenerative Growth

Hippo signaling is a conserved pathway that regulates growth during development and regeneration, and its deregulation is associated with oncogenesis (reviewed in [76, 77]). This signaling pathway is constituted by a kinase cascade that can be activated by different stimuli. Hippo signaling is mediated by a transcriptional coactivator protein, Yorkie (Yki in *Drosophila*, YAP in vertebrates: reviewed in [77, 78]) (Figure 2). Yki remains inactive when the signaling pathway is active and it is retained in the cytoplasm due to its phosphorylation by the kinase Warts (Wts) [79]. When Wts is inactive, unphosphorylated Yki accumulates in the nucleus [77, 78] and in conjunction with different DNA-binding proteins, it promotes the transcription of downstream genes necessary to promote cell proliferation, such as Cyclin E and cMyc [77, 78] (Figures 3 and 4).

The Hippo pathway plays a key role in inducing regenerative growth after disc damage [80–82]. This pathway can be activated by multiple upstream inputs, including Fat–Dachsous signaling, sense tissue damage, and JNK signaling [82, 83]. JNK signaling can directly promote the activation of Yki by phosphorylating Ajuba family LIM proteins and enhancing their binding to Wts, thereby preventing their activation by Hippo [84]. Interestingly, the ability of JNK to activate YAP is conserved in mammalian cells [83, 84]. Thus, JNK increases Yki activity after wounding, a process essential to induce compensatory cell proliferation and regeneration.

7. The Control of Cell Plasticity during Imaginal Disc Regeneration by the Polycomb Group (PcG)

One of the processes associated with organ regeneration is the repatterning of the regenerating tissue, which implies genetic reprogramming of cells in order to switch their fates (Figure 4). After damage, newly formed tissue is derived from surviving cells that lie nearby and some of these cells must change their state of determination to contribute to the lost region.

During disc regeneration several observations indicate that cell fates are respecified and that there is a process of cell reprogramming. For example, there is a temporary loss of markers of cell fate commitment after genetic ablation or disc amputation [9, 12, 85]. It has also been reported that after genetic ablation in the wing pouch, the cells of the hinge generate cells that become part of the pouch [68, 86]. Moreover, cell fate changes between compartments have been reported after surgical excision [66] or genetic ablation [87]. Indeed, cells near the anterior/posterior or dorsal/ventral boundary can change their identities and contribute to the compartment on the other side of the boundary [87]. Finally,

during regeneration the cells of one disc occasionally acquire the identities of different imaginal discs, switching cell fate and generating disc-inappropriate structures, a process known as transdetermination [88].

The preservation of a specific cell fate or determination state depends on a particular genetic program, which is largely maintained through epigenetic modifications that are established during development. The polycomb group (PcG) proteins function as epigenetic modifiers and they are required to maintain cell fates by controlling the expression of developmental regulators [89]. This group of proteins forms two different types of complexes, Polycomb repressive complex 1 (PRC1) and Polycomb repressive complex 2 (PRC2). PcG can silence large numbers of genes by establishing repressive marks like histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3). There is evidence that JNK signaling downregulates PcG genes during regeneration, thereby allowing the transcription of otherwise silenced genes [90]. This process is important for cell reprogramming during regeneration. Inappropriate or excessive downregulation of the PcG by JNK during regeneration may activate genes that induce a genetic program corresponding to a different disc, provoking transdetermination. Indeed, the frequency of transdetermination is enhanced in PcG mutant discs [90]. Interestingly, ectopic activation of *wg* can induce transdetermination, possibly because *wg* might be a direct target of the PcG [90].

The preservation of the anterior/posterior compartment identity during regeneration is mediated by *taranis* (*tara*), that is, the homologue in *Drosophila* of the vertebrate TRIP-Br (Transcriptional Regulators Interacting with plant homeodomain (PHD) zinc fingers and/or Bromodomains) family of proteins. In mutant conditions for *tara*, regenerating wing disc undergoes posterior-to-anterior transformations late in regeneration. These changes are consequence of the misregulation of posterior selector gene *engrailed* (*en*). The deregulation of *en* leads to the autoregulatory silencing of the *engrailed* locus, which requires the PRC1. The misregulation and subsequent silencing of *en* are induced by JNK signaling. It has been proposed that Tara stabilizes *engrailed* expression downstream of JNK signaling to maintain the posterior cell fate identity during regeneration [91].

Recently, a defined regulatory element was identified that is responsible for the activation of *wg* expression after damage [92]. Interestingly, this regenerative enhancer (BRV118) regulates the expression of *wg* and *wnt6*. This observation suggests that the function of different members of Wnt family might be involved during regeneration in *Drosophila*. It has been described that within this enhancer there is a damage-responsive module that remains active throughout the third instar stage and an adjacent silencing element that nucleates increasing levels of epigenetic silencing during development. This latter element can restrict the activity of this enhancer [92]. Therefore, the loss of the regenerative capacity of the discs as development proceeds might be explained by a blockade of the damage-responsive enhancers through the activity of the silencing elements. This mechanism might prevent gene expression in the mature organism without compromising the gene activity regulated by developmental signals [92]. Interestingly, PcG-mediated epigenetic silencing

is required to regulate the activity of this enhancer. Hence, the inability of the cells in adult tissue to reactivate programs necessary to promote regenerative growth or cell fate respecification could limit regeneration in adult stages.

8. Perspectives

The urodele amphibians have been used extensively as a model system to study regeneration as they present a remarkable regenerative capacity and they can fully regenerate amputated appendages [93]. While the studies carried out on these organisms allowed multiple cellular processes involved in limb regeneration to be identified [93], much less is known about the genetic mechanisms that control them, as amphibians are not the best model organisms for genetic analyses. Moreover, most studies into regenerative biology aimed at developing biomedical applications have been carried out on stem cells cultivated *in vitro*. To better understand the processes that occur during regeneration, these phenomena must be studied *in vivo*, in the context of the complex genetic and cellular interactions that take place. *Drosophila* is a complex model organism in which the mechanistic details of genetic and cellular processes can be defined. In addition, *Drosophila* has been extensively used as a model system to carry out unbiased genetic screens to identify genes involved in different cellular processes. These features make *Drosophila* an excellent model to identify and characterize genes involved in all aspects of regeneration. In fact, different genetic screens and studies of the changes in gene expression during disc regeneration have identified multiple signaling pathways and genes required for different processes associated with regeneration [23, 24, 94].

The conservation between flies and vertebrates of basic signaling pathways and their regulatory elements justifies using *Drosophila* as a model organism to establish mechanisms and genetic processes that can be translated to vertebrates. Different studies have confirmed that most of the signaling pathways required for disc regeneration are also involved in regeneration in vertebrates; for example, the Hippo pathway appears to play a fundamental role in vertebrate limb regeneration and in skin wound healing [95, 96]. JNK is very important in mammalian liver regeneration and one of its targets, the AP-1 transcription factor subunit c-Jun, is activated during liver regeneration [97–99], the cytokines TNF- α and IL-6 also being required during this process [99]. Finally, and as in *Drosophila*, PcGs are downregulated during murine skin repair, which provokes the derepression of *dmyc* [100]. Moreover, it has been suggested that that loss of polycomb-mediated silencing might contribute to the induction of repair genes in mammals.

In summary, basic regenerative research carried out in *Drosophila* can provide insights into the genetic and cellular responses involved in mammalian regeneration. This knowledge might serve to develop new therapies in regenerative medicine.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank Ali Kiai for helping to improve the manuscript. This work was supported by a grant obtained from the MEC (BFU2014-54153-P) and it has greatly benefited from the financial support of the Fundacion Ramon Areces.

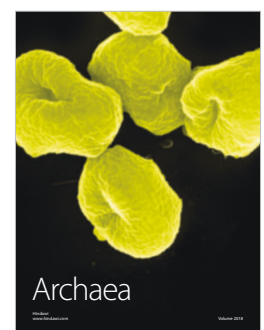
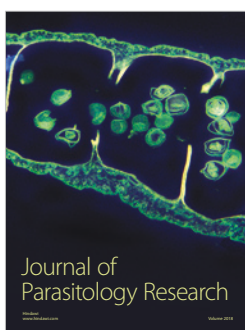
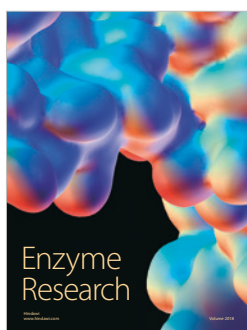
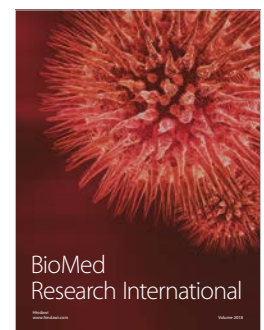
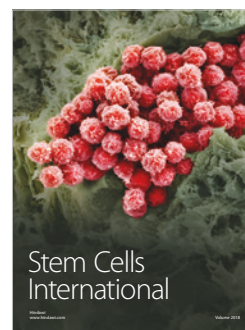
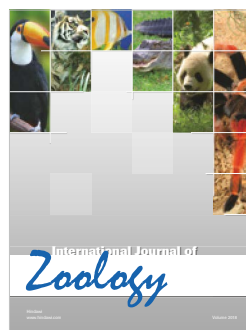
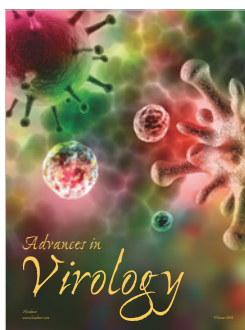
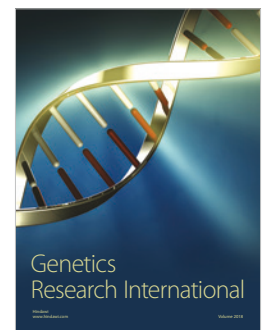
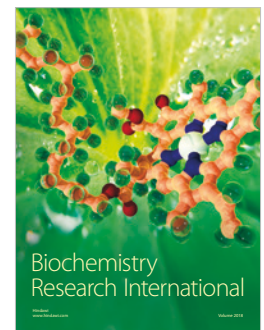
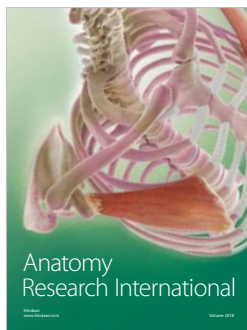
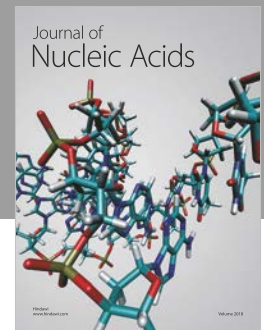
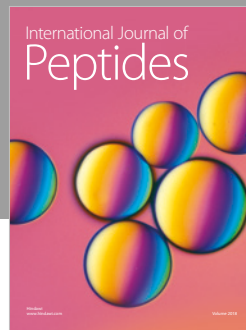
References

- [1] E. M. Tanaka and P. W. Reddien, "The cellular basis for animal regeneration," *Developmental Cell*, vol. 21, no. 1, pp. 172–85, 2011.
- [2] A. Sanchez Alvarado and P. A. Tsonis, "Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models," *Nature Reviews Genetics*, vol. 7, no. 11, pp. 873–84, 2006.
- [3] E. Hadorn, G. Anders, and H. Ursprung, "Combination derived from partial dissociated imaginal disks of various mutants and types of *Drosophila*," *Journal of Experimental Zoology*, vol. 142, pp. 159–175, 1959.
- [4] E. Hadorn and D. Buck, "Ueber Entwicklungsleistungen transplantierter teilstücke von Flügel-Imaginalschiben von *Drosophila melanogaster*," *Revue suisse de Zoologie*, vol. 69, pp. 302–310, 1962.
- [5] E. Hadorn, R. Hürliemann, G. Mindek, G. Schubiger, and M. Staub, "Developmental capacity of embryonal blastema in *Drosophila* following cultivation in an adult host," *Revue suisse de Zoologie*, vol. 75, no. 3, pp. 557–569, 1968.
- [6] B. D. Stein, "Hormones and tissue competence in the development of *Drosophila*," *The Biological Bulletin*, vol. 84, pp. 34–58, 1943.
- [7] P. J. Bryant, "Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*," *Developmental Biology*, vol. 26, no. 4, pp. 637–651, 1971.
- [8] M. Bosch, J. Baguna, and F. Serras, "Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs," *The International Journal of Developmental Biology*, vol. 52, no. 8, pp. 1043–1050, 2008.
- [9] R. K. Smith-Bolton, M. I. Worley, H. Kanda, and I. K. Hariharan, "Regenerative Growth in *Drosophila* Imaginal Discs Is Regulated by Wingless and Myc," *Developmental Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 797–809, 2009.
- [10] C. Bergantinos, M. Corominas, and F. Serras, "Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signaling," *Development*, vol. 137, no. 7, pp. 1169–1179, 2010.
- [11] J. C. Pastor-Pareja, M. Wu, and T. Xu, "An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*," *Disease Model Mechanisms*, vol. 1, no. 2–3, pp. 144–54, 2008.
- [12] S. Diaz-Garcia and A. Baonza, "Pattern reorganization occurs independently of cell division during *Drosophila* wing disc regeneration in situ," in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, p. 13032, 2013.
- [13] C. Bergantinos, X. Vilana, M. Corominas, and F. Serras, "Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology," *Bioessays*, vol. 32, no. 3, pp. 207–17, 2010.
- [14] J. M. Harris, V. Esain, G. M. Frechette et al., "Glucose metabolism impacts the spatiotemporal onset and magnitude of HSC induction in vivo," *Blood*, vol. 121, no. 13, pp. 2483–2493, 2013.
- [15] D. Hernandez-Garcia, C. D. Wood, S. Castro-Obregon, and L. Covarrubias, "Reactive oxygen species: A radical role in development?" *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 49, no. 2, pp. 130–43, 2010.
- [16] K. M. Holmstrom and T. Finkel, "Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, no. 6, pp. 411–421, 2014.
- [17] T. Finkel, "Signal transduction by reactive oxygen species," *The Journal of Cell Biology*, vol. 194, no. 1, pp. 7–15, 2011.
- [18] W. Razzell, I. R. Evans, P. Martin, and W. Wood, "Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through duox activation and hydrogen peroxide release," *Current Biology*, vol. 23, no. 5, pp. 424–429, 2013.
- [19] C. Gauron, C. Rampon, M. Bouzaffour et al., "Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed," *Scientific Reports*, vol. 3, article 2084, 2013.
- [20] N. R. Love, Y. Chen, S. Ishibashi et al., "Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration," *Nature Cell Biology*, vol. 15, no. 2, pp. 222–228, 2013.
- [21] Y. Shi, F. Nikulenkova, J. Zawacka-Pankau et al., "ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis," *Cell Death & Differentiation*, vol. 21, no. 4, pp. 612–623, 2014.
- [22] P. Santabarbara-Ruiz, M. Lopez-Santillan, I. Martinez-Rodriguez et al., "ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during *Drosophila* Regeneration," *PLoS Genet*, vol. 11, no. 10, Article ID e1005595, 2015.
- [23] S. J. Khan, S. N. F. Abidi, A. Skinner, Y. Tian, and R. K. Smith-Bolton, "The *Drosophila* Duox maturation factor is a key component of a positive feedback loop that sustains regeneration signaling," *PLoS Genetics*, vol. 13, no. 7, Article ID e1006937, 2017.
- [24] A. R. Brock, M. Seto, and R. K. Smith-Bolton, "Cap-n-Collar promotes tissue regeneration by regulating ROS and JNK signaling in the *drosophila melanogaster* wing imaginal disc," *Genetics*, vol. 206, no. 3, pp. 1505–1520, 2017.
- [25] C. E. Fogarty, N. Diwanji, J. L. Lindblad et al., "Extracellular Reactive Oxygen Species Drive Apoptosis-Induced Proliferation via *Drosophila* Macrophages," *Current Biology*, vol. 26, no. 5, pp. 575–584, 2016.
- [26] F. Serras, "The benefits of oxidative stress for tissue repair and regeneration," *Flight Journal*, vol. 10, no. 3, pp. 128–133, 2016.
- [27] N. Diwanji and A. Bergmann, "An unexpected friend - ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: Implications for regeneration and cancer," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2017.
- [28] M. Bosch, F. Serras, E. Martin-Blanco, and J. Baguna, "JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs," *Developmental Biology*, vol. 280, no. 1, pp. 73–86, 2005.
- [29] Y. Y. Lo, J. M. Wong, and T. F. Cruz, "Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 26, pp. 15703–15707, 1996.
- [30] Y. Son, S. Kim, H. T. Chung, and H. O. Pae, "Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases," *Methods Enzymol*, vol. 528, pp. 27–48, 2013.
- [31] K. Tobiume, A. Matsuzawa, T. Takahashi et al., "ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis," *EMBO Reports*, vol. 2, no. 3, pp. 222–228, 2001.

- [32] P. Ilmarinen, E. Moilanen, and H. Kankaanranta, "Mitochondria in the center of human eosinophil apoptosis and survival," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, no. 3, pp. 3952–3969, 2014.
- [33] J. Varkey, P. Chen, R. Jemmerson, and J. M. Abrams, "Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in *Drosophila*," *The Journal of Cell Biology*, vol. 144, no. 4, pp. 701–710, 1999.
- [34] E. Abdelwahid, T. Yokokura, R. J. Krieser, S. Balasundaram, W. H. Fowle, and K. White, "Mitochondrial Disruption in *Drosophila* Apoptosis," *Developmental Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 793–806, 2007.
- [35] M. Thomenius, C. D. Freel, S. Horn et al., "Mitochondrial fusion is regulated by Reaper to modulate *Drosophila* programmed cell death," *Cell Death & Differentiation*, vol. 18, no. 10, pp. 1640–1650, 2011.
- [36] A. Clavier, A. Rincheval-Arnold, J. Colin, B. Mignotte, and I. Guénal, "Apoptosis in *Drosophila*: Which role for mitochondria?" *Apoptosis*, vol. 21, no. 3, pp. 239–251, 2016.
- [37] M. H. Brodsky, W. Nordstrom, G. Tsang, E. Kwan, G. M. Rubin, and J. M. Abrams, "*Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus," *Cell*, vol. 101, no. 1, pp. 103–113, 2000.
- [38] E. Shlevkov and G. Morata, "A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*," *Cell Death & Differentiation*, vol. 19, no. 3, pp. 451–460, 2012.
- [39] B. S. Wells, E. Yoshida, and L. A. Johnston, "Compensatory Proliferation in *Drosophila* Imaginal Discs Requires Dronc-Dependent p53 Activity," *Current Biology*, vol. 16, no. 16, pp. 1606–1615, 2006.
- [40] B. S. Wells and L. A. Johnston, "Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in *Drosophila* by p53," *Dev Biol*, vol. 361, no. 2, pp. 263–76, 2012.
- [41] P. Pichiule, A. Schmidt, and S. Vannucci, "Hypoxia-inducible factor-1 mediates neuronal expression of the receptor for advanced glycation end products following hypoxia/ischemia," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 36330–36340, 2007.
- [42] I. Feine, I. Pinkas, Y. Salomon, and A. Scherz, "Local oxidative stress expansion through endothelial cells—a key role for gap junction intercellular communication," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, Article ID e41633, 2012.
- [43] A. Perez-Garijo and H. Steller, "Spreading the word: Non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease," *Development*, vol. 142, no. 19, pp. 3253–3262, 2015.
- [44] S. Diaz-Garcia, S. Ahmed, and A. Baonza, "Analysis of the function of apoptosis during imaginal wing disc regeneration in *Drosophila melanogaster*," *PLoS One*, vol. 11, no. 11, Article ID e0165554, 2016.
- [45] M. Ramet, R. Lanot, D. Zachary, and P. Manfruell, "JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*," *Developmental Biology*, vol. 241, no. 1, pp. 145–56, 2002.
- [46] J. Mattila, L. Omelyanchuk, S. Kytälä, H. Turunen, and S. Nökkälä, "Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc," *The International Journal of Developmental Biology*, vol. 49, no. 4, p. 391, 2005.
- [47] M. La Fortezza, M. Schenk, A. Cosolo, A. Kolybaba, I. Grass, and A.-K. Classen, "JAK/STAT signalling mediates cell survival in response to tissue stress," *Development*, vol. 143, no. 16, pp. 2907–2919, 2016.
- [48] T. Katsuyama, F. Comoglio, M. Seimiya, E. Cabuy, and R. Paro, "During *Drosophila* disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell proliferation with Dilp8-mediated developmental delay," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, no. 18, pp. E2327–E2336, 2015.
- [49] A. Ayala-Camargo, A. M. Anderson, M. Amoyel, A. B. Rodrigues, M. S. Flaherty, and E. A. Bach, "JAK/STAT signaling is required for hinge growth and patterning in the *Drosophila* wing disc," *Developmental Biology*, vol. 382, no. 2, pp. 413–426, 2013.
- [50] N. I. Arbouzova and M. P. Zeidler, "JAK/STAT signalling in *Drosophila*: Insights into conserved regulatory and cellular functions," *Development*, vol. 133, no. 14, pp. 2605–2616, 2006.
- [51] M. P. Zeidler, E. A. Bach, and N. Perrimon, "The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway," *Oncogene*, vol. 19, no. 21, pp. 2598–2606, 2000.
- [52] Y.-C. Tsai and Y. H. Sun, "Long-range effect of Upd, a ligand for Jak/STAT pathway, on cell cycle in *Drosophila* eye development," *Genesis*, vol. 39, no. 2, pp. 141–153, 2004.
- [53] T. Mukherjee, J. C. Hombria, and M. P. Zeidler, "Opposing roles for *Drosophila* JAK/STAT signalling during cellular proliferation," *Oncogene*, vol. 24, no. 15, pp. 2503–2511, 2005.
- [54] E. A. Bach, S. Vincent, M. P. Zeidler, and N. Perrimon, "A Sensitized Genetic Screen to Identify Novel Regulators and Components of the *Drosophila* Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway," *Genetics*, vol. 165, no. 3, pp. 1149–1166, 2003.
- [55] J. L. Leatherman and S. Di Nardo, "Zfh-1 controls somatic stem cell self-renewal in the *Drosophila* testis and nonautonomously influences germline stem cell self-renewal," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 1, pp. 44–54, 2008.
- [56] A. Garelli, A. M. Gontijo, V. Miguela, E. Caparros, and M. Dominguez, "Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation," *Science*, vol. 336, no. 6081, pp. 579–582, 2012.
- [57] J. Colombani, D. S. Andersen, and P. Léopol, "Secreted peptide dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing," *Science*, vol. 336, no. 6081, pp. 582–585, 2012.
- [58] J. S. Jaszczak, J. B. Wolpe, A. Q. Dao, and A. Halme, "Nitric oxide synthase regulates growth coordination during *Drosophila melanogaster* imaginal disc regeneration," *Genetics*, vol. 200, no. 4, pp. 1219–1228, 2015.
- [59] J. S. Jaszczak and A. Halme, "Arrested development: coordinating regeneration with development and growth in *Drosophila melanogaster*," *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 40, pp. 87–94, 2016.
- [60] J. S. Jaszczak, J. B. Wolpe, R. Bhandari, R. G. Jaszczak, and A. Halme, "Growth coordination during *Drosophila melanogaster* imaginal disc regeneration is mediated by signaling through the relaxin receptor Lgr3 in the prothoracic gland," *Genetics*, vol. 204, no. 2, pp. 703–709, 2016.
- [61] D. M. Vallejo, S. Juárez-Carreño, J. Bolívar, J. Morante, and M. Dominguez, "A brain circuit that synchronizes growth and maturation revealed through Dilp8 binding to Lgr3," *Science*, vol. 350, no. 6262, article no. 6767, 2015.
- [62] A. Garelli, F. Heredia, A. P. Casimiro et al., "Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing," *Nature Communications*, vol. 6, article no. 8732, 2015.

- [63] C. L. Stoick-Cooper, R. T. Moon, and G. Weidinger, "Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine," *Genes & Development*, vol. 21, no. 11, pp. 1292–1315, 2007.
- [64] C. L. Stoick-Cooper, G. Weidinger, K. J. Riehle et al., "Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration," *Development*, vol. 134, no. 3, pp. 479–489, 2007.
- [65] K. D. McClure, A. Sustar, and G. Schubiger, "Three genes control the timing, the site and the size of blastema formation in *Drosophila*," *Developmental Biology*, vol. 319, no. 1, pp. 68–77, 2008.
- [66] M. C. Gibson and G. Schubiger, "Hedgehog is required for activation of engrailed during regeneration of fragmented *Drosophila* imaginal discs," *Development*, vol. 126, no. 8, pp. 1591–1599, 1999.
- [67] A. Sustar, M. Bonvin, M. Schubiger, and G. Schubiger, "Drosophila twin spot clones reveal cell division dynamics in regenerating imaginal discs," *Developmental Biology*, vol. 356, no. 2, pp. 576–587, 2011.
- [68] S. C. Herrera, R. Martin, and G. Morata, "Tissue homeostasis in the wing disc of *Drosophila melanogaster*: immediate response to massive damage during development," *PLoS Genet*, vol. 9, no. 4, Article ID e1003446, 2013.
- [69] C. Martin-Castellanos and B. A. Edgar, "A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing," *Development*, vol. 129, no. 4, pp. 1003–1013, 2002.
- [70] D. Nellen, R. Burke, G. Struhl, and K. Basler, "Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient," *Cell*, vol. 85, no. 3, pp. 357–368, 1996.
- [71] R. D. St Johnston, F. M. Hoffmann, R. K. Blackman et al., "Molecular organization of the decapentaplegic gene in *Drosophila melanogaster*," *Genes & Development*, vol. 4, no. 7, pp. 1114–1127, 1990.
- [72] R. Burke and K. Basler, "Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing," *Development*, vol. 122, no. 7, pp. 2261–2269, 1996.
- [73] G. Morata, E. Shlevkov, and A. Perez-Garijo, "Mitogenic signaling from apoptotic cells in *Drosophila*," *Dev Growth Differ*, vol. 53, no. 2, pp. 168–76, 2011.
- [74] A. Perez-Garijo, E. Shlevkov, and G. Morata, "The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc," *Development*, vol. 136, no. 7, pp. 1169–1177, 2009.
- [75] A. Perez-Garijo, F. A. Martin, and G. Morata, "Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*," *Development*, vol. 131, no. 22, pp. 5591–5598, 2004.
- [76] B. V. V. G. Reddy and K. D. Irvine, "The fat and warts signaling pathways: New insights into their regulation, mechanism and conservation," *Development*, vol. 135, no. 17, pp. 2827–2838, 2008.
- [77] B. Zhao, K. Tumaneng, and K.-L. Guan, "The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal," *Nature Cell Biology*, vol. 13, no. 8, pp. 877–883, 2011.
- [78] H. Oh and K. D. Irvine, "Yorkie: the final destination of Hippo signaling," *Trends in Cell Biology*, vol. 20, no. 7, pp. 410–417, 2010.
- [79] J. Huang, S. Wu, J. Barrera, K. Matthews, and D. Pan, "The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP," *Cell*, vol. 122, no. 3, pp. 421–434, 2005.
- [80] G. Sun and K. D. Irvine, "Control of growth during regeneration," *Curr Top Dev Biol*, vol. 108, pp. 95–120, 2014.
- [81] X. Su, J. Fricke, D. G. Kavanagh, and D. J. Irvine, "In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles," *Molecular Pharmacology*, vol. 8, no. 3, pp. 774–87, 2011.
- [82] F. A. Grusche, J. L. Degoutin, H. E. Richardson, and K. F. Harvey, "The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in *Drosophila melanogaster*," *Developmental Biology*, vol. 350, no. 2, pp. 255–266, 2011.
- [83] G. Sun and K. D. Irvine, "Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors," *Developmental Biology*, vol. 350, no. 1, pp. 139–151, 2011.
- [84] G. Sun and K. D. Irvine, "Ajuba family proteins link JNK to hippo signaling," *Science Signaling*, vol. 6, no. 292, article no. ra81, 2013.
- [85] A. Repiso, C. Bergantiños, and F. Serras, "Cell fate respecification and cell division orientation drive intercalary regeneration in *Drosophila* wing discs," *Development*, vol. 140, no. 17, pp. 3541–3551, 2013.
- [86] S. Verghese and T. T. Su, "Drosophila Wnt and STAT Define Apoptosis-Resistant Epithelial Cells for Tissue Regeneration after Irradiation," *PLoS Biol*, vol. 14, no. 9, Article ID e1002536, 2016.
- [87] S. C. Herrera and G. Morata, "Transgressions of compartment boundaries and cell reprogramming during regeneration in *Drosophila*," *ELife*, vol. 3, p. e01831, 2014.
- [88] E. Hadorn, "Transdetermination in cells.," *Scientific American*, vol. 219, no. 5, pp. 110–114, 1968.
- [89] L. Ringrose and R. Paro, "Epigenetic regulation of cellular memory by the polycomb and trithorax group proteins," *Annual Review of Genetics*, vol. 38, pp. 413–443, 2004.
- [90] N. Lee, C. Maurange, L. Ringrose, and R. Paro, "Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs," *Nature*, vol. 438, no. 7065, pp. 234–237, 2005.
- [91] K. J. Schuster and R. K. Smith-Bolton, "Taranis Protects Regenerating Tissue from Fate Changes Induced by the Wound Response in *Drosophila*," *Developmental Cell*, vol. 34, no. 1, pp. 119–128, 2015.
- [92] R. E. Harris, L. Setiawan, J. Saul, and I. K. Hariharan, "Localized epigenetic silencing of a damage-activated WNT enhancer limits regeneration in mature *Drosophila* imaginal discs," *eLife*, vol. 5, no. 2016, Article ID e11588, 2016.
- [93] J. P. Brockes and A. Kumar, "Comparative aspects of animal regeneration," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 24, pp. 525–49, 2008.
- [94] E. Blanco, M. Ruiz-Romero, S. Beltran et al., "Gene expression following induction of regeneration in *Drosophila* wing imaginal discs. Expression profile of regenerating wing discs," *BMC Developmental Biology*, vol. 10, article no. 94, 2010.
- [95] S. Hayashi, K. Tamura, and H. Yokoyama, "Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for *Xenopus* limb bud regeneration," *Developmental Biology*, vol. 388, no. 1, pp. 57–67, 2014.
- [96] M. J. Lee, M. R. Byun, M. Furutani-Seiki, J. H. Hong, H. S. Jung, and YAP, "AP and TAZ regulate skin wound healing," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 134, no. 2, pp. 518–525, 2014.

- [97] P. Akerman, P. Cote, S. Q. Yang et al., "Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy," *American Journal of Physiology*, vol. 263, no. 4, pp. 579–585, 1992.
- [98] R. F. Schwabe, C. A. Bradham, T. Uehara et al., "c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration," *Hepatology*, vol. 37, no. 4, pp. 824–832, 2003.
- [99] Y. Yamada, I. Kirillova, J. J. Peschon, and N. Fausto, "Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: Deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 4, pp. 1441–1446, 1997.
- [100] T. Shaw and P. Martin, "Epigenetic reprogramming during wound healing: Loss of polycomb-mediated silencing may enable upregulation of repair genes," *EMBO Reports*, vol. 10, no. 8, pp. 881–886, 2009.



RESEARCH ARTICLE

Analysis of the Function of Apoptosis during Imaginal Wing Disc Regeneration in *Drosophila melanogaster*

Sandra Diaz-Garcia², Sara Ahmed¹, Antonio Baonza^{1*}

¹ Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain,

² University of California San Diego, Biology Section of Cell & Developmental Biology, United States of America

* abaonza@cbm.csic.es



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Diaz-Garcia S, Ahmed S, Baonza A (2016) Analysis of the Function of Apoptosis during Imaginal Wing Disc Regeneration in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE 11(11): e0165554. doi:10.1371/journal.pone.0165554

Editor: Madhuri Kango-Singh, University of Dayton, UNITED STATES

Received: March 31, 2016

Accepted: October 13, 2016

Published: November 28, 2016

Copyright: © 2016 Diaz-Garcia et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by a grant obtained from the MEC (BFU2014-54153-P). SDG was supported by an FPI fellowship from the MICINN.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Regeneration is the ability that allows organisms to replace missing organs or lost tissue after injuries. This ability requires the coordinated activity of different cellular processes, including programmed cell death. Apoptosis plays a key role as a source of signals necessary for regeneration in different organisms. The imaginal discs of *Drosophila melanogaster* provide a particularly well-characterised model system for studying the cellular and molecular mechanisms underlying regeneration. Although it has been shown that signals produced by apoptotic cells are needed for homeostasis and regeneration of some tissues of this organism, such as the adult midgut, the contribution of apoptosis to disc regeneration remains unclear. Using a new method for studying disc regeneration in physiological conditions, we have defined the pattern of cell death in regenerating discs. Our data indicate that during disc regeneration, cell death increases first at the wound edge, but as regeneration progresses dead cells can be observed in regions far away from the site of damage. This result indicates that apoptotic signals initiated in the wound spread throughout the disc. We also present results which suggest that the partial inhibition of apoptosis does not have a major effect on disc regeneration. Finally, our results suggest that during disc regeneration distinct apoptotic signals might be acting simultaneously.

Introduction

Regeneration allows organisms to restore the original shape, size and function of body parts that have been lost or damaged. The imaginal wing discs of *Drosophila melanogaster* have the capacity to regenerate during the larval stages and provide a particularly well-characterised model system for analysing this phenomenon (review [1]). The imaginal wing discs are sac-like structures that give rise to the wing and notum of the adult. The cells that constitute the discs are specified early in embryogenesis. They start to divide during the first larval stage and continue proliferating until the end of larval development. Since a series of classic experiments by Ernst Hadorn (1940s to the 1970) [2–4] laid the basis for understanding imaginal disc

regeneration, different experimental approaches have been used to study this process in *Drosophila*. Classically disc regeneration has been studied in amputated discs that were cultivated into the abdomen of an adult host where the cells of the discs proliferate but do not differentiate [2,5,6]. More recently, a new system based on the *Gal4/UAS* binary system, in combination with a temperature-sensitive Gal4 suppressor, Gal80^{ts}, has been developed to genetically ablate a region of the wing disc. This method allows the induction of cell death in specific domains of the discs for a limited period of time, after which the discs recover [7–8]. The results obtained from these studies have provided fundamental principles for a variety of cellular and molecular processes involved in organ regeneration, such as tissue remodelling, migration, cell de-differentiation, patterning, and control of cell proliferation (review in [1, 9,10]). All these processes must be precisely regulated and coordinated during regeneration to restore the size and pattern of the damaged organ. Recently different reports have shown that apoptosis plays essential functions during animal regeneration [11–13]. One of the model organisms that has provided the most compelling evidence for the contribution of apoptosis in regeneration is the freshwater polyp Hydra [14]. When the body of the Hydra is transversally sectioned, apoptosis is triggered only in the lower half, that is the fragment that will re-grow a head, whereas it is undetectable in the upper part that will form a new foot. The ectopic induction of cell death in the upper part induces head formation and gives rise to a doubled-headed Hydra [14]. Apoptosis has also been shown to function during regeneration in vertebrate animals such as in the case of *Xenopus* tadpoles [15] and in wound healing and liver regeneration in mice [16–17].

In *Drosophila* the role of cell death during disc regeneration remains largely unknown. The different experimental procedures used to study disc regeneration present different problems and have led to inconclusive results. Disc cutting and transplantation assays suggest that apoptosis does not play an important role during disc regeneration, as disc regeneration seems to proceed normally when cell death is suppressed by the over-expression of the baculoviral caspase inhibitor p35 [18]. However, these experiments do not allow the analysis of the pattern and size of the adult regenerated wings, thus it is not possible to determine whether regeneration is normally completed. Furthermore, disc transplantation and *in vivo* culture conditions increases the number of dead cells throughout the discs, even in control non-amputated discs [18–19], therefore it remains unknown whether apoptosis increases during disc regeneration.

The genetic ablation experiments rely on the expression of pro-apoptotic genes in a specific region of the discs; consequently cell death cannot be blocked in the targeted region, and it is not possible to examine the effects that this produces during regeneration [7–8]. Moreover, the ectopic expression of the pro-apoptotic genes may promote different cellular responses not associated with regeneration; for instance it has been shown that apoptotic cells can induce non-autonomous cell death in neighbouring cells [20]. Accordingly, a non-autonomous increase of cell death in regenerating discs might be caused by the ectopic induction of the apoptotic genes and not directly by the regeneration process. Thus, it still remains to be determined whether apoptosis is involved in disc regeneration [12, 20].

We recently have developed a method to study disc regeneration *in vivo* in physiological conditions [21]. With this system is possible to study disc regeneration in its normal developmental context. Furthermore, it is also possible to examine the possible effects of blocking apoptosis on determination of the final size and pattern of the adult regenerating wings. We have taken advantage of this method to define the pattern of apoptosis at different times during disc regeneration. Our results indicate that in regenerating discs, cell death increases firstly at the wound edge, but as regeneration progresses apoptosis is extended throughout the disc. We have also found that partial inhibition of apoptosis does not have a major effect on disc regeneration. Finally, our data also suggest that during disc regeneration distinct mechanisms to induce cell death might be cooperating.

Materials and Methods

Drosophila stocks and genetics

The following stocks and *Gal4* lines were used:

The UAS lines used included: *UAS-GFP* (Bloomington stock center), *UAS-hep^{CA}* (II) [22], *UAS-puc2A* [23], *UAS-Diap1(III)* [24], *UAS-p35(III)* (Bloomington stock center), and *UAS-eiger* (a gift from G. Morata) [25].

We used the *Gal4* lines *enGal4 UAS-GFP/CyO*, *nubGal4/CyO*. We obtained these lines from Gines Morata (CBM, Madrid). *Hh-dsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/TM6B* (a gift from Carlos Estella). All of these stocks have been previously described in FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

The reporter *puc-LacZ* line [23].

The flies stocks *eiger¹/CyO* and *eiger³/S-T* (a gift from Hermann Steller) [20].

Immunocytochemistry

Immunostaining of the wing discs was performed according to standard protocols. The following antibodies were used: rabbit anti-cleaved Caspase-3 (Cell Signaling); rabbit anti-Phospho-histone 3 (Upstate; 1:1000); mouse anti-CD2 (1:100; Serotech mouse anti-β-Galactosidase (Promega Z3778A; 1:200); mouse anti-Dl (C594.9B; 1:50); and mouse anti-Wg (4D4; 1:100), were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa. Secondary antibodies (Molecular Probes) were used at dilutions of 1:200.

Analysis of cell proliferation and the expression patterns of different markers in control animals were performed by crossing *en-Gal4 UAS-GFP/CyO* flies to wildtype (wt).

Analysis of regeneration under conditions that prevented apoptosis

This analysis was performed by crossing *w; en-Gal4 UAS-GFP/CyO* to *w; nub-Gal4; UAS p35(III)* or to *w; nub-Gal4; UAS-dIAP1(III)* or to *UAS-puc(II)*. To study *eiger* function during regeneration *eiger¹; Hh-dsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/S-T* flies were crossed to *eiger³/eiger³*.

Larvae were raised at 25°C before the surgical elimination of the fragment and were maintained at that temperature for the rest of the development.

Ectopic activation of JNK signalling

This analysis was performed by crossing *w; en-Gal4 UAS-GFP/CyO; tub Gal80^{ts}/TM6b* to *w; UAS-hep^{CA}(II)* or to *w; UAS-eiger*.

w; en-Gal4 UAS-GFP/UAS-hep^{CA}; tub Gal80^{ts}/+ or with *w; UAS-eiger* larvae were raised at 17°C until 240 hrs after egg laying (AEL) and then shifted to 29°C for 24 hrs before analyzing the expression of Cas3* or PH3. To study ectopic activation of JNK in *eiger* mutants, *eiger¹; Hh-dsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/S-T* flies were crossed to *eiger³; pucLacZ/TM6B*.

Imaginal disc manipulation and analysis

Surgical ablation was performed on mid-late third instar *en-Gal4 UAS-GFP* larvae or *w; en-Gal4 UAS-GFP/+; nub-Gal4/+* (120–140 hrs AEL). Unless otherwise indicated larvae were raised at 25°C. The expression of *UAS-GFP* in the posterior compartment or the entire wing pouch driven by *en-Gal4* or *nub-Gal4* respectively enabled the identification of the discs inside the larvae using a binocular microscope (Leica MZFLIII) and UV light. A section of the posterior or anterior/posterior compartment was removed by closing a pair of forceps over the wing disc without breaking the larval cuticle. The larvae were maintained on ice during this process.

In vitro culture

Imaginal discs were cultured as described [26] except that we do not add Ecdysone to the medium. The discs cultivated were *eiger*¹ / *eiger*³; *pucLacZ*/+ or controls *pucLacZ*.

Mitotic and apoptotic index

We calculated the mitotic and apoptotic index as the average value of the ratio between the number of cells in mitosis or dying in the posterior or anterior compartments, as detected by the expression of phospho-histone3 (PH3) and Caspase-3, respectively, and the size of the compartment in μm (PH3-positive or Cas3* cells/size of the compartment). We analyzed at least 5 discs for each experiment. We only considered the wing blade and hinge territories.

Results

Pattern of cell death during wing disc regeneration

The contribution of cell death to disc regeneration has remained elusive, as none of the experimental approaches used to study this process have allowed it to be defined [18]. We first have examined the parameters of cell death in regenerating discs using a method developed by us that allows the study of disc regeneration in its normal developmental context [21]. Using this system we have amputated a fragment of the posterior compartment of *en-Gal4 UAS-GFP* wing discs, and analysed discs labelled with cleaved Caspase-3 (Cas3*) antibody at different times after amputation; as a control we used the contra-lateral non-amputated wing discs. Surgical sections were inflicted in third instar larval discs (120–140 hrs AEL). We observed that during the first 3 hrs of regeneration the number of dead cells was not significantly increased in the wing blade region, and we only found a few dead cells close to the wound edge (Figs 1 and 2). However, at 6 hrs after amputation (AC), the number of dead cells strongly increased at the wound edge as well as in regions adjacent to it, extending along the DV (Figs 1 and 2, and S1 Fig). Interestingly, even though we only eliminated a fragment of the posterior compartment, we observed that Caspase-3 is also expressed in the anterior compartment, in regions far away from the wound edge (Fig 1, S1 and S2 Figs). To confirm that the Caspase-3 staining in the anterior compartment corresponds to apoptotic cells and not to cellular debris or to posterior apoptotic cells that have moved away from the wound site, we double stained regenerating discs for Caspase-3 and DAPI. As seen in transverse sections (S2 Fig), we found Caspase-3 positive cells in the anterior compartment that are still integrated in the columnar epithelium. In addition, in contrast to posterior dying cells, that always expressed GFP, the anterior apoptotic cells do not express this marker. All these data indicate that during regeneration cell death can be induced in regions far away from the wound.

We found similar results in wing discs analysed at later stages (20 hrs AC) (Figs 1 and 2, S1 and S2 Figs). At this stage we frequently observed clusters of dead cells in the anterior compartment (Fig 1 and S2 Fig). The increasing number of dead cells decreased in discs analysed at 48 hrs AC (Figs 1 and 2). The elimination of a fragment of the anterior compartment causes similar defects to those observed when we amputate part of the posterior compartment [21].

Altogether, our data indicate that during disc regeneration, apoptosis is first activated at the wound edge and in adjacent regions, but as regeneration progresses an apoptotic signal, or mechanical tension, induces cell death throughout the wing disc.

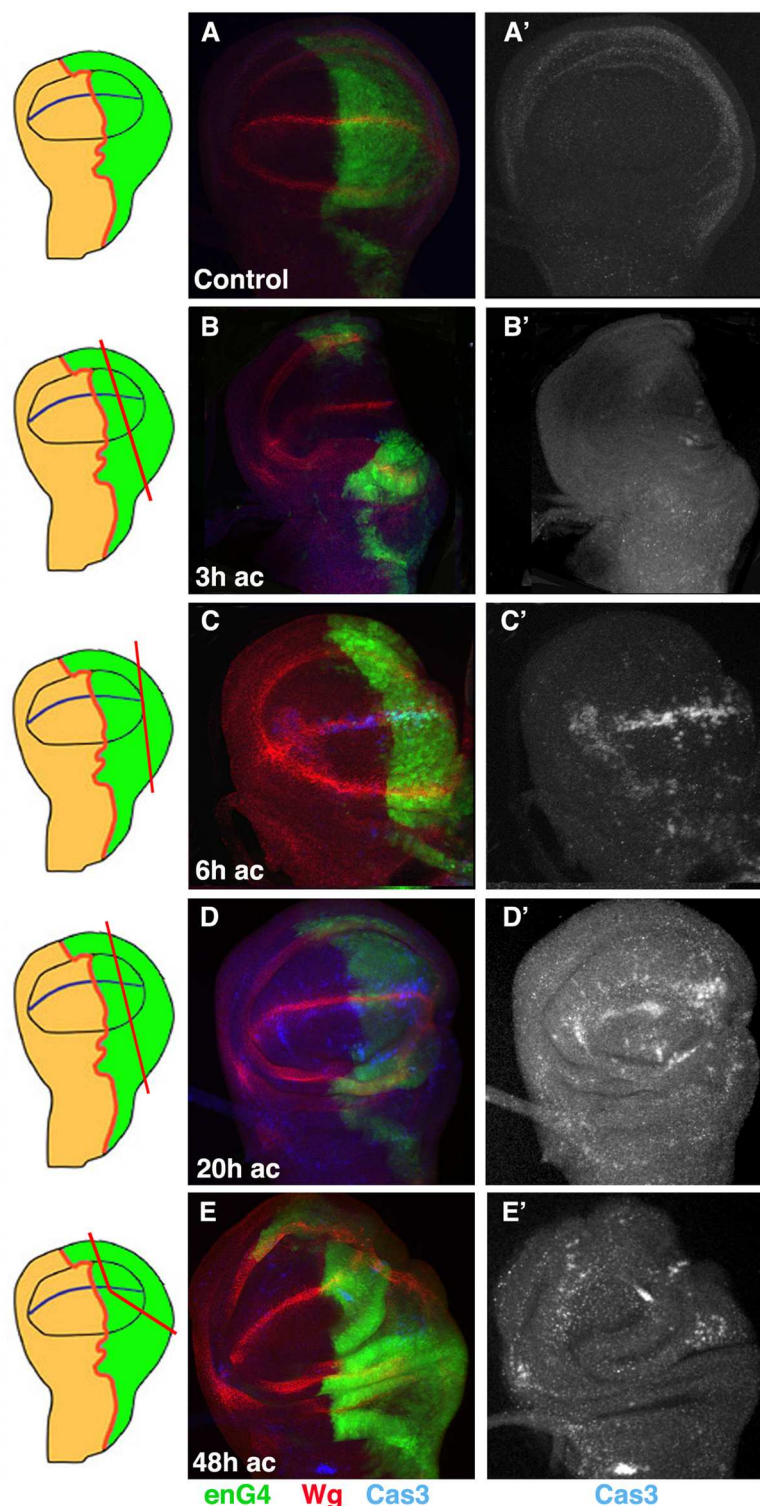


Fig 1. Pattern of cell death during wing disc regeneration. (A-E') Third instar wing *en-Gal4 UAS-GFP* discs stained for the apoptotic marker anti-cleaved Caspase-3 (blue in A-E, and grey in A'-E') and anti-Wg (red A-E). (A-A') Control discs. (B-B') Regenerating discs at 3 hrs after cut (AC). We only observed a few dead cells at the wound edge or in the region adjacent. (C-C') Regenerating discs at 6 hrs AC; we observed a significant increase in the number of dead cells in the posterior, as well as the anterior compartments. Note the increased number of dying cells along the d/v boundary. (D-D') 20 hrs AC, we still observed a high number

of apoptotic cells throughout the wing disc. (E-E') 48 hrs AC, there is a reduction in the number of dead cells in both compartments. Schematic illustrations on the left indicate the cutting lines and the regions eliminated in each disc.

doi:10.1371/journal.pone.0165554.g001

Ectopic expression of DIAP is not sufficient to block cell death during regeneration

We explored the possible requirement of apoptosis during disc regeneration by analysing the effects caused by the inhibition of cell death in regenerating discs. To this end we over-expressed different factors that suppressed cell death. One important family of Caspase inhibitors are the IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins), which can bind to and inhibit Caspases. In cells that are committed to die, the proapoptotic genes Reaper, Hid, and Grim inhibit the activity of the *Drosophila* IAP1 (dIAP). We first tried to block cell death in regenerating discs by over-expressing *dIAP*. As described above, in regenerating control discs cell death increases not only in the region near to the wound edge, but also in regions far away from it. Thus, we observed apoptotic cells in the anterior compartment, even though we only amputated a fragment of the posterior compartment. Therefore, to better evaluate the role of cell death during regeneration we over-expressed dIAP1 in the entire wing pouch. To this end we expressed *UAS-dIAP1* under the control of *en-Gal4* together with *nub-Gal4*, which drives the expression of Gal4 in the wing pouch. We amputated part of the posterior or anterior compartment of these discs and analysed the spatial and temporal pattern of cell death and proliferation in regenerating wing discs at different times AC. We found that at the different times analysed, the distribution of Caspase-3 positive cells in amputated discs that over-express dIAP1 is very similar to that observed in control amputated discs (Fig 3 compared with Fig 1) (Apoptotic index in the wing blade of these discs at 20 hrs AC is $0,0018 \pm 0,0004$, $n = 5$ vs $0,0014 \pm 0,0003$ in Control regenerating discs $n = 8$). As previously reported for control amputated discs [21], we observed that between 18–24 hours after amputation, cell proliferation increases in the region near to the wound edge, as assayed with the mitotic marker (PH3) (Mitotic index $0,0037 \pm 0,0007$ in regenerating discs that over-expressed dIAP1, $n = 7$ vs $0,0021 \pm 0,0005$ in control non amputated contralateral discs, $n = 7$, $p < 0.01$). The increased proliferation in these discs is similar to that observed in control regenerating discs ($1,76 \pm 0,3$ vs $1,7 \pm 0,1$ in control

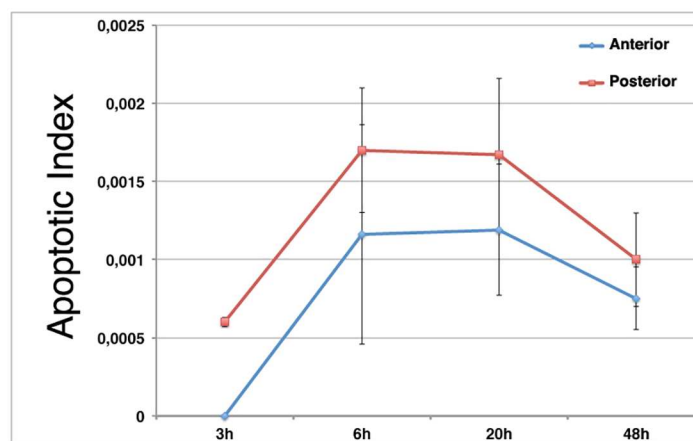


Fig 2. Cell death during wing disc regeneration. Bar chart shows the average apoptotic index in the posterior (black square) and anterior (grey) compartments of regenerating discs at different times AC. The error bars represent the standard deviation.

doi:10.1371/journal.pone.0165554.g002

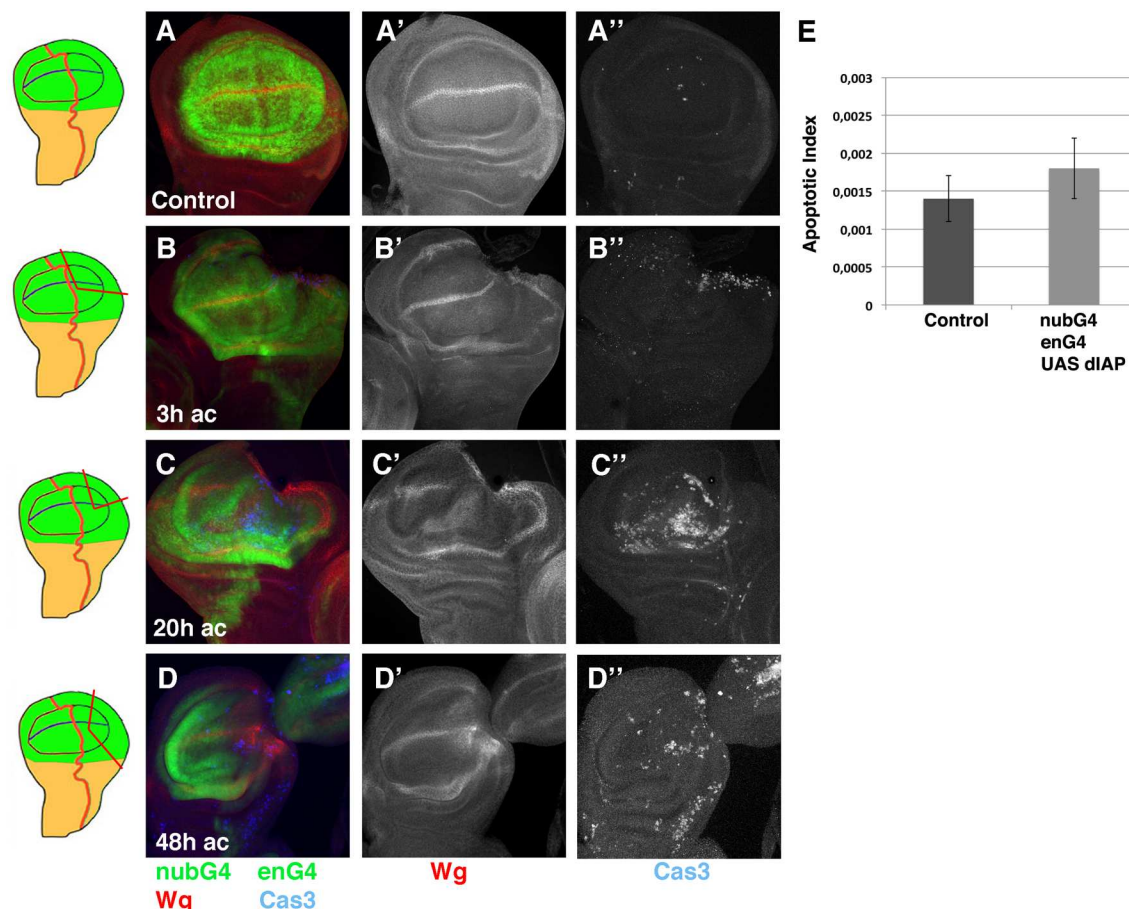


Fig 3. The over-expression of *dIAP* is not sufficient to block apoptosis during disc regeneration. (A-D'') Third instar wing *en-Gal4 UAS-GFP / nub-Gal4; UAS-dIAP1/+* discs stained for anti-cleaved Caspase-3 (blue in A-D, and grey in A''-D'') and anti-Wg (red A-D and grey A'-D'). (A-A'') Control *en-Gal4 UAS-GFP / nub-Gal4; UAS-dIAP1/+* disc. (B-B'') Regenerating *en-Gal4 UAS-GFP / nub-Gal4; UAS-dIAP1/+* discs at 3 hrs AC. As in control discs, we found a few dead cells at the wound edge or in the region adjacent. (C-C'') 20 hrs AC, we observed a high number of dead cells throughout the wing blade. (D-D'') 48 hrs AC, as observed in control discs, at this time there is a reduction in the number of dead cells in both compartments. (E) Bar chart shows the average apoptotic index in control regenerating discs (Control) and *en-Gal4 UAS-GFP / nub-Gal4; UAS-dIAP1/+ (nubG4 enG4 UAS dIAP1)* discs at 20hrs AC. Here and in the rest of figures the error bars represent the standard deviation. Schematic illustrations on the left indicate the cutting lines and the regions eliminated in each disc.

doi:10.1371/journal.pone.0165554.g003

regenerating discs) (S3 Fig) [21]. Moreover, as it occurs in control regenerating wings discs between 18–20 hrs AC, the expression of Wingless (Wg) disappears from part of the dorsal-ventral (d/v) boundary in 69% (n = 9) of the wing discs analysed (in control regenerating discs Wg disappear in 76% n = 29). The size of adult regenerated wings derived from these discs is comparable to control regenerated wings (data not shown). All these data imply that the ectopic expression of dIAP1 is not disturbing disc regeneration, in addition they also suggest that the over-expression of dIAP1 is not sufficient to block apoptosis during disc regeneration.

JNK signalling is required to induce apoptosis during disc regeneration

Our results indicate that regeneration promotes cell death not only in the region adjacent to the wound edge, but also in regions that were away from it. This effect suggests the existence of one or more signals that are activated near the damaged epithelia and that spread throughout the rest of the disc. Different reports have shown that the Jun-N terminal Kinase (JNK)

signalling pathway plays an important role during regeneration and its function is also involved in the induction of apoptosis [19, 27–31]. During disc regeneration, this pathway is initially activated in the cells that form the wound edge, but as regeneration progresses its activity expands to most of the cells within the disc [19] (S4 and S5 Figs). Recently, it has been shown that apoptotic cells can also induce non-autonomous cell death in neighbouring cells and tissues [20]. Interestingly this process, that has been termed apoptosis-induced apoptosis, relies on the production of the TNF ortholog Eiger by apoptotic cells [20]. This factor activates the JNK pathway in neighbouring cells and in adjacent regions, inducing them to die [12,20]. All these results are consistent with a possible function of this signaling pathway in the induction of apoptosis in cells adjacent to the wound as well as in regions far away from it during regeneration.

We explored the possible function of the JNK signalling pathway promoting cell death during regeneration by analysing the expression of Caspase-3 in regenerating *eiger* loss of function mutant discs. To this end we amputated a fragment of *eiger*³/*eiger*¹; *Hh-dsRed Ci-Gal4* UAS-GFP/+ wing discs and analysed the apoptotic pattern. We found that in these discs cell death was strongly reduced at 20 hrs AC compared to control regenerating discs (Apoptotic index is 0,0018±0,0004, n = 5 in control regenerating discs vs 0,00077±0,00018, n = 5 in *eiger*³/*eiger*¹; *Hh-dsRed Ci-Gal4* UAS-GFP/+ regenerating discs, p<0.01) (Fig 4). However, we still observed a significant number of dead cells specifically in the region close to the wound site (Fig 4 and S6 Fig). We also have examined the pattern of cell proliferation in *eiger*³/*eiger*¹ mutant regenerating discs. We found that in contrast to control regenerating discs, that at 20 hrs AC show a strong increase of cell proliferation in the damaged region (1,7±0,1, n = 7 higher than in control non-damaged region), in *eiger*³/*eiger*¹ mutant regenerating discs cell proliferation is only slightly increased (1,3 ± 0,2 n = 4, p<0.01) (Fig 5). In addition, we found that 6 hrs AC the amputated *eiger*³/*eiger*¹ discs are unhealed, at this time wound healing is completed in control discs (S4 Fig). Finally in contrast to control regenerating discs, that show a partial loss of Wg expression at 20 hrs AC (see above) [21], in *eiger*³/*eiger*¹ regenerating discs the expression of Wg remains unaffected during regeneration (S6 Fig). All these data suggests that in the *eiger*³/*eiger*¹ mutant, disc regeneration is arrested or delayed. This is consistent with previous reports which indicate that the over-expression of the phosphatase *puckered* (*puc*), which controls the activity of JNK signalling by a negative feedback loop [23], inhibits or delays wound healing and regeneration [19]. We found similar results when *puc* is over-expressed in regenerating discs that were amputated using our method (S7 Fig).

Our data suggest that *eiger* plays an important role in activating autonomous and non-autonomous apoptosis during disc regeneration. However, the presence of numerous dead cells in regenerating *eiger* mutant discs, in contrast with the complete suppression of apoptosis in these mutant discs after cell death induction [20] implies that during disc regeneration, in addition to JNK signalling, other signaling pathways might be involved in the induction of apoptosis. Alternatively, JNK might be activated by other mechanisms independently of Eiger, or both processes might be operating together during disc regeneration. The JNK signalling pathway can be triggered via a number of means in different contexts [32–33], therefore we first examined the activity of JNK signalling in *eiger*³/*eiger*¹ regenerating discs. To this end we used a LacZ insertion in the gene *puckered* (*puc*). As previously reported, we observed that in regenerating control discs this reporter was activated firstly at the wound edge, but later expanded to most of the cells of the wing blade [19] (S4 and S5 Figs). Interestingly, we found that although the expression of *puc-LacZ* is strongly down-regulated in regenerating *eiger*³/*eiger*¹ discs compared to control regenerating discs, we observed some cells at the wound edge that express high levels of this reporter (analysed at 6 hrs and 20 hrs AC) (S4 and S5 Figs). These data suggest that in addition to Eiger, other mechanisms and signals activate JNK signalling during disc regeneration at the wound edge.

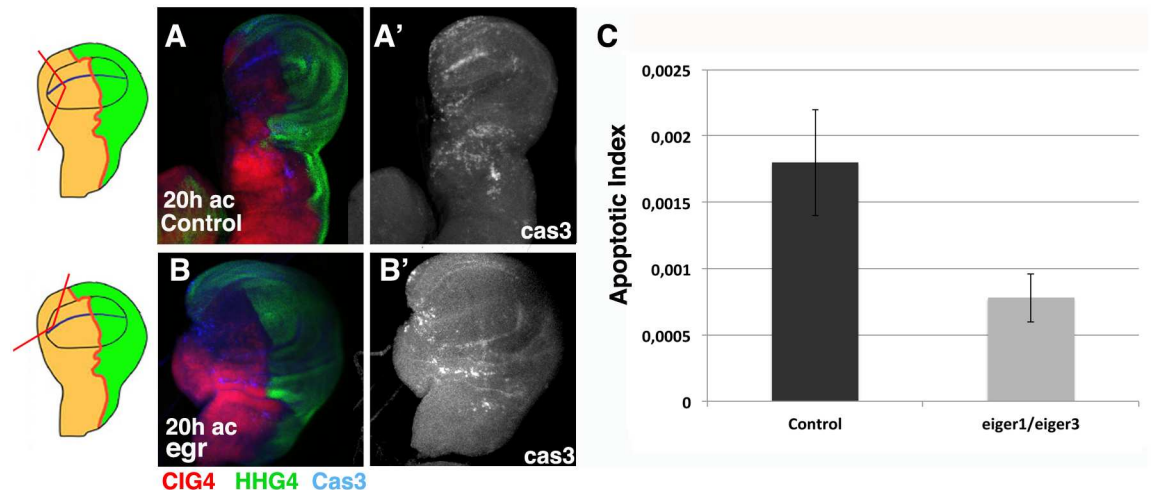


Fig 4. Apoptosis is reduced in *egr¹/egr³* regenerating discs. (A-B') Third instar wing discs stained for the apoptotic marker anti-cleaved Caspase-3 (blue in A-B, and grey in A'-B'). (A-A') Control *HhdsRed-CiGal4 UAS-GFP/+* regenerating discs amputated in the anterior compartment. (B-B') Regenerating *eiger³/eiger¹; HhdsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/+* discs at 20 hrs after cut. We found that there is a reduction in the number of dead cells in both compartments. (C) Bar chart shows the average apoptotic index in control regenerating discs amputated in the anterior compartment (Control) and *eiger³/eiger¹; HhdsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/+ (eiger³/eiger¹)* regenerating discs at 20 hrs AC. Note that the apoptotic index of discs amputated in the anterior compartment is very similar to that observed in discs amputated in the posterior compartment (see Fig 2). Schematic illustrations on the left indicate the cutting lines and the regions eliminated in each disc.

doi:10.1371/journal.pone.0165554.g004

The existence of apoptotic cells in regenerating *eiger* mutant discs far away from the wound edges suggest that the induction of apoptosis during disc regeneration does not only depend on the apoptosis-induced apoptosis mechanism triggered by Eiger. Consistent with this hypothesis, we found that the temporary ectopic expression of *eiger* using the Gal4/Gal80^{Ts} system (see M&M), causes massive apoptosis in the targeted region (posterior compartment, autonomous cell death), but only induces the apoptosis of a few cells in the anterior compartment (non autonomous cell death) (cell death density $0.00027647 \pm 3.84519E-05$, $n = 5$ in the anterior compartment of discs over-expressing *eiger* vs 0.00119 ± 0.00042 , $n = 8$ in the anterior compartment of control regenerating discs) (Fig 6). Thus, cell death was 4 times higher in the anterior compartment of control regenerating discs than in discs over-expressing *eiger*. Moreover, in contrast to control regenerating discs, most of the dead cells in the anterior compartment of these mutant discs were adjacent to the anterior/posterior boundary (Fig 6 compare to Fig 1). We have found that the ectopic activation of JNK signalling by the over-expression of an activated form of *hemipterous* (*hep^{CA}*) [34] cause similar effects (cell death density $0.000251323 \pm 6.98223E-05$, $n = 5$ in the anterior compartment of discs over-expressing *hep^{CA}* vs 0.00119 ± 0.00042 , $n = 8$ in the anterior compartment of control regenerating discs) (Fig 6). Altogether our results imply that the activation of JNK signaling is not sufficient alone to induce the strong pattern of apoptosis in regions both adjacent and far away from the wound observed in regenerating discs, and suggest that additional mechanisms are involved in the induction of cell death during regeneration.

Ectopic expression of p35 in regenerating discs

Our results indicate that neither the ectopic expression of dIAP or the down-regulation of JNK was sufficient to completely eliminate apoptosis during disc regeneration. To further study the role of apoptosis during regeneration we have examined whether the over-expression of the baculoviral caspase inhibitor p35, which blocks effector caspases without affecting initiator

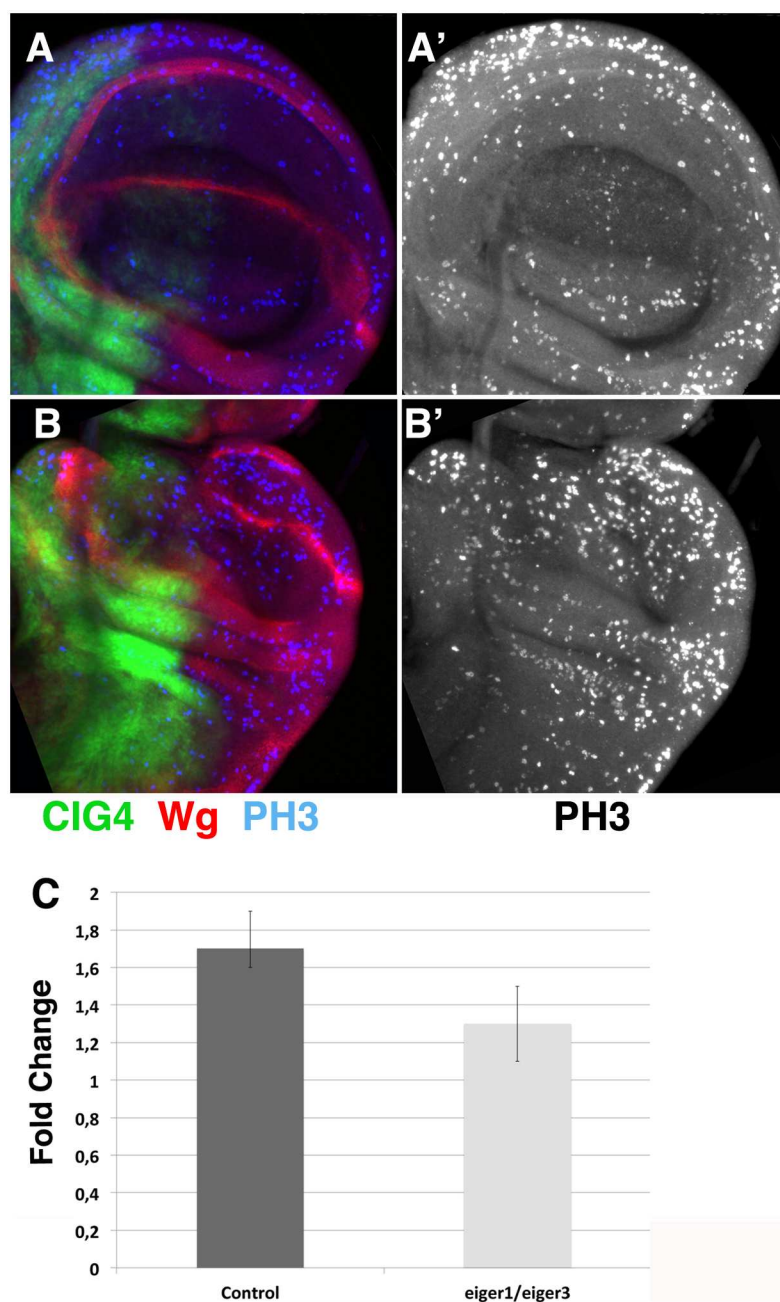


Fig 5. Regenerative growth is reduced in *egr1/egr3* regenerating discs. (A-B') Third instar wing discs stained for the mitotic marker phospho-Histone H3 (blue in A-B, and grey in A'-B') and anti-Wg (red in A-B). (A-A') Control *HhdsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/+* disc. (B-B') Regenerating *eiger3/eiger1; HhdsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/+* discs at 20 hrs after cut. We found that there is a reduction in the number of mitotic cells in both compartments. (C) Bar charts show the average fold change in the mitotic index of control regenerating discs (control), and *eiger3/eiger1; HhdsRedCi-Gal4 UAS-GFP/+* regenerating discs (*eiger3/eiger1*) at 20 hrs AC, compared to control non-regenerating discs.

doi:10.1371/journal.pone.0165554.g005

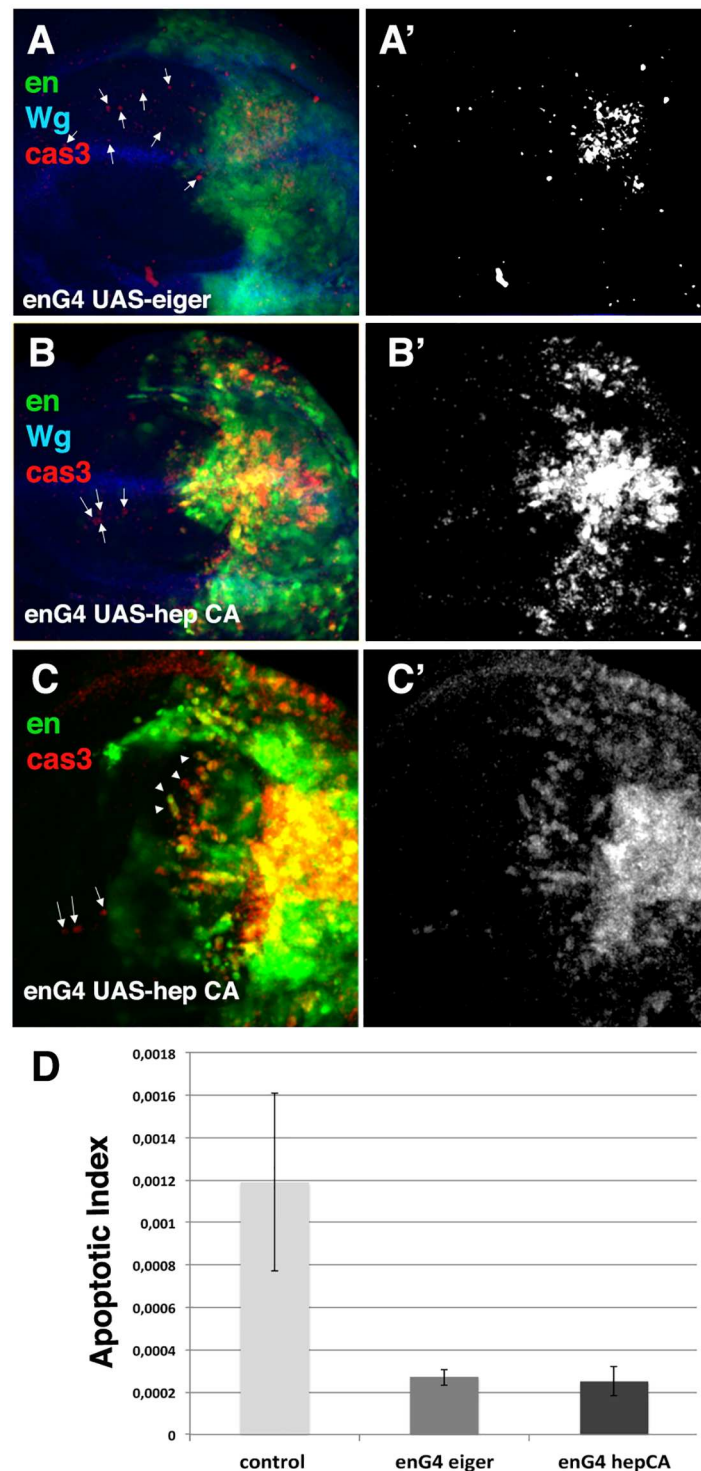


Fig 6. Ectopic activation of JNK signalling is not sufficient to induce the "non autonomous" cell death observed in regenerating control discs. (A-C') Third instar *en-Gal4 UAS-eiger UAS-GFP/Tub-Gal80^{ts}* wing discs (A-A'), and *en-Gal4 UAS-hep^{CA} UAS-GFP/Tub-Gal80^{ts}* wing discs (B-C'). Larvae were shifted from 17°C to 29°C for 24 hrs before the staining. The discs were stained with anti-cleaved Caspase-3 (red in A-C, and grey in A'-C'); anti-Wg (blue A-B). (A-A') The ectopic expression of *eiger* in the posterior compartment only induces the apoptosis of a few scattered cells in the anterior compartment (arrows), compared with regenerating discs Fig 1. (B-B') Although cell death is massively induced in the posterior compartment of *en-Gal4 UAS-hep^{CA} UAS-GFP/Tub-Gal80^{ts}* discs, we only found a few apoptotic cells in the

anterior compartment (arrows). (C-C') High magnification of *en-Gal4 UAS-hep^{CA} UAS-GFP/Tub-Gal80^{ts}* discs. Most apoptotic cells in the A/P boundary are posterior cells, since they also express GFP (arrowheads), only a few dead cells are anterior (arrows). (D) Bar chart shows the average apoptotic index in the anterior compartment of control regenerating discs (control), *en-Gal4 UAS-eiger UAS-GFP/Tub-Gal80^{ts}* (enG4 eiger) and discs *en-Gal4 UAS-hep^{CA} UAS-GFP/Tub-Gal80^{ts}* (enG4 hepCA). Cell death index $0,000251323 \pm 6,98223E-05$, $n = 5$ and $0,00027647 \pm 3,84519E-05$, $n = 5$ in the anterior compartment of discs over-expressing *hep^{CA}* and *eiger* respectively vs $0,00119 \pm 0,00042$, $n = 8$ in the anterior compartment of control regenerating discs.

doi:10.1371/journal.pone.0165554.g006

caspace [35], is sufficient to totally block cell death during regeneration. To this end we have amputated *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35/+* discs and analysed cell death 20 hrs AC. Previously it has been shown that in *in vivo* cultivated regenerating discs, the ectopic expression of *p35* almost completely suppressed apoptosis [18]. Consistent with this, we observed that at 20 hrs AC the number of cells expressing the apoptotic marker Caspase-3 is strongly reduced in *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35* discs compared to control regenerating discs (S8 Fig). However, we still observed cells that express this marker in regions near to the wound as well as in regions far away from it (S8 Fig). We next examined whether the partial suppression of apoptosis observed in these discs alters the pattern of cell proliferation associated with regeneration. It has been proposed that the ectopic expression of *p35* in a context where apoptosis increases can generate undead cells. These type of cells produce mitotic signals that promote the over proliferation of surrounding tissue [36–38]. Thus, it is possible that the presence of undead cells perturb cell proliferation in these discs and the spreading of survival signals. We studied the spatial and temporal pattern of cell proliferation in *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35/+* regenerating discs at 20 hrs AC (Fig 7). We have previously shown that at this time the density of mitotic cells in the amputated compartment was $1,7 \pm 0,1$ ($n = 7$) higher than in non-amputated compartment. We found similar results in *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35/+* regenerating discs, since at 20 hrs AC the mitotic density in the amputated compartment of these discs was $1,56 \pm 0,15$ ($n = 5$) higher than in the non-amputated compartment (Fig 7). As previously reported for control regenerating discs, we observed that most of the mitotic cells were located in the region adjacent to the wound.

To further analyse whether regeneration was perturbed in *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35/+* regenerating discs, we examined the expression of Wg. As in control regenerating discs, we observed that in 60% ($n = 7$) of the *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35* regenerating discs the expression of Wg disappeared from part of the D/V boundary in the region close to the wound edge. In all these cases the down-regulation of Wg expands more than 15 cell rows from the wound site [21] (Fig 8). As we found in control regenerating discs, in *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35/+* regenerating discs the vein/intervein pattern is disrupted during regeneration (Fig 8) [21].

Finally, we examined the adult regenerated wings developed from *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35/+* larvae amputated at different times during development. As observed in control regenerated wings, dependent on the time when the amputation was performed, we found different categories of regenerated adult wings. When the cut was produced late in development (140–160 Hours AEL, 0–24h before puparium formation (BPF), we find that as in controls, 100% of the adult regenerated wings displayed lack of wing tissue ($n = 220$ control vs $n = 25$ of *nub-Gal4 UAS-p35/+* wings) (S9 Fig). Most of the wing discs of *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35/+* larvae amputated at earlier stages (120–140 hr AEL, 24–48h BPF), gave rise to adult wings that contain small or large nicks (86%, $n = 7$), and 14% of the wing analysed have completed the regeneration process and were normal compared with the control contra-lateral wing. These results are similar to those observed in control regenerated wings amputated at that stage, thus 76% of these wings contain nicks, whereas 23% have completed the regeneration process

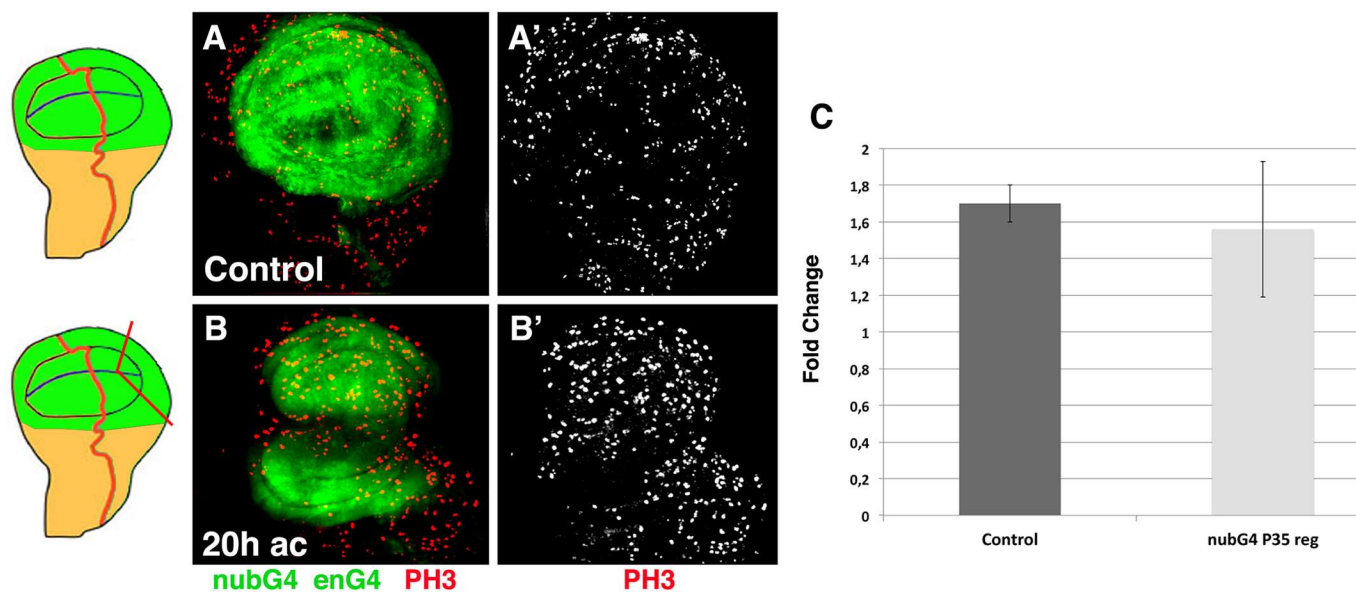


Fig 7. Pattern of cell proliferation in *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* regenerating discs. (A-B') Third instar wing discs stained for the mitotic marker Phospho-Histone H3 (red in A-B, and grey in A'-B'). (A-A') *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* control contralateral discs. (B-B') *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* regenerating disc at 20 hrs AC. (C) Bar charts show the average fold change in the mitotic index of control regenerating discs (control), and *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* regenerating discs (nubG4 P35 Reg) at 20 hrs AC. Schematic illustrations on the left indicate the cutting lines and the regions eliminated in each disc.

doi:10.1371/journal.pone.0165554.g007

(n = 220) (in this later category we included the normal patterned regenerated wings that were smaller than control contra-lateral wing [21]).

Altogether our data indicate that the partial suppression of apoptosis produced by the ectopic expression of *p35* in regenerating discs has a minor effect in the process of regeneration.

Discussion

Regeneration involves multiple cellular processes to restore the damaged organs or tissues. One of the mechanisms that has been proposed to play a key role as a source of signals required for regeneration in different organisms is apoptosis [11–13]. Apoptotic cells generate multiple signals that can influence the surrounding cells in different ways. The mitogenic properties of apoptotic cells are largely known; dying cells produce secreted diffusible mitogenic signals that stimulate cell proliferation [12]. In addition, recently it has been described that cell death can also induce non-autonomous cell death in neighbouring cells [20]. This process, of apoptosis-induced apoptosis can induce synchronized communal death, a mechanism that might play different roles in the extensive remodelling and morphogenetic events that take place during regeneration. Although the *Drosophila* imaginal discs have been used as a classical model to study regeneration, little is known about the role that apoptosis may play during disc regeneration. The main difficulty in studying the contribution of apoptosis to the regeneration of the discs relies on the different experimental approaches that have been used. The classical method to study disc regeneration—disc transplantation—causes massive cell death even in control non-amputated discs [18–19], therefore it is impossible to know whether regeneration induces cell death. The more recently developed assays of genetic ablation rely on the expression of pro-apoptotic genes in a specific region of the discs, whereby it is not possible to block cell

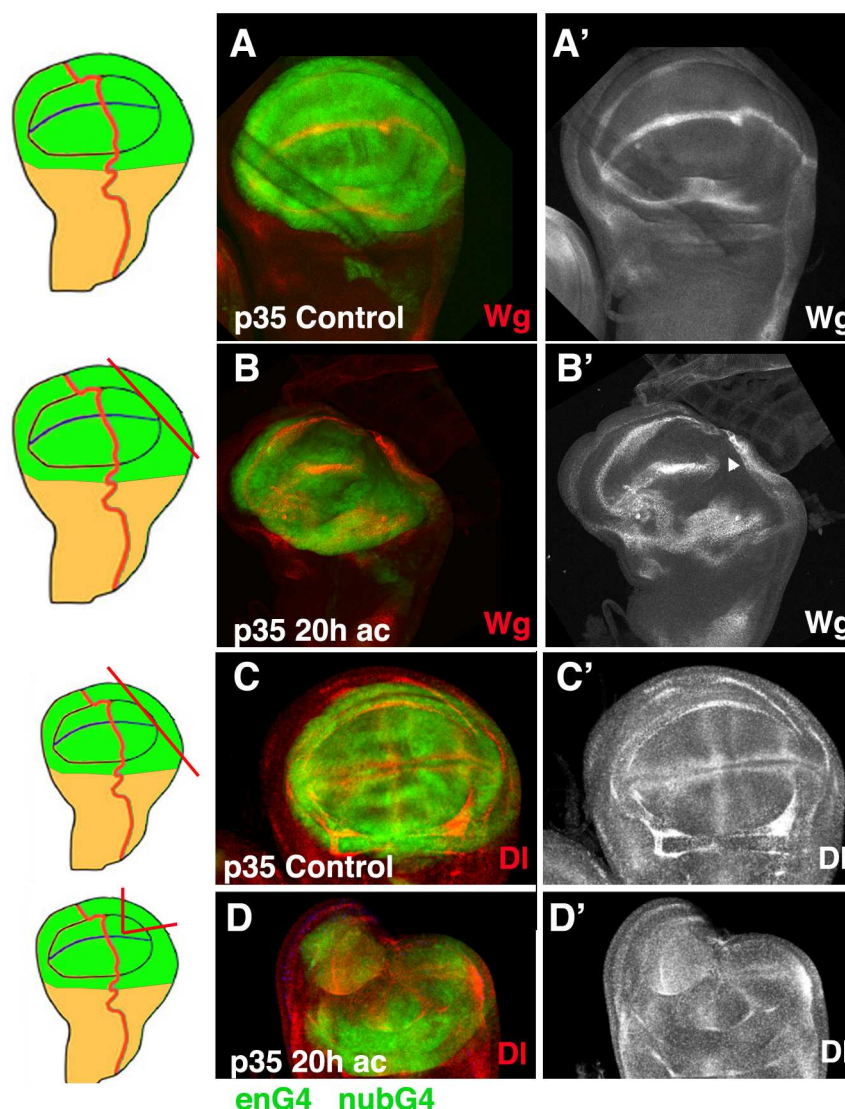


Fig 8. Expression of Wg and Delta in regenerating *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* discs 20 hrs AC. (A-B') Expression of Wg, shown by anti-Wg (red in A-B, and grey A'-B'). (C-D') Expression of Delta (red in C-D, and grey C'-D'). (A-A' and C-C') Control *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* third instar non amputated discs. (B-B' and D-D') *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* regenerating discs at 20hrs AC. On the left, illustrations of the discs are shown indicating the cutting lines and the regions eliminated in the discs shown by panels A-D. (B-B') Example of an *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* regenerating disc at 20 hrs AC in which the expression of Wg disappears in the d/v boundary near the wound edge (arrowhead in B'). In this disc the expression of the internal ring of Wg was restored. (D-D') The vein/intervein pattern defined by DI was disrupted in *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* regenerating discs dissected 20 hrs AC (D-D' compared to C-C').

doi:10.1371/journal.pone.0165554.g008

death in the damaged region. We have used a method to study disc regeneration in physiological conditions that has allowed us to define the pattern of cell death that occurs during this process. Our results indicate that after the amputation of a fragment of the disc, cell death increases, firstly at wound edge, but as regeneration progresses apoptosis is expanded throughout the disc. Using our method, we have evaluated the contribution of cell death to the early stages of disc regeneration.

One of the limitations of our system is that the earliest time in which we can eliminate a fragment of the discs is between 96–120h AEL. We have previously shown that during this interval of time the amputated discs can fully regenerate and give rise to a completely regenerated adult wing [21]. In addition, recent results from our group suggest that at that time the different signals associated to regenerative growth such as JNK, Hippo signaling and JAK/Stat are activated (SD-G, SA and AB, in preparation). All these data suggest that in our experimental conditions, the regenerative response is similar to that described at earlier stages. However, we cannot rule out that cell death might be playing a different function during earlier stages of regeneration.

Apoptosis-induced apoptosis mechanism during disc regeneration

The pattern of cell death that we have observed in regenerating discs is consistent with a model in which dead cells generated at the wound edge can induce cell death throughout the entire disc by an apoptosis-induced apoptosis mechanism. It has been shown that this process relies on the production of *Eiger* by the dying cells, which activates the JNK pathway in neighbouring cells, inducing them to die [20]. The evolution of the activity of this signaling pathway during disc regeneration, firstly at the wound edge and later in most of the cells of the wing pouch, is consistent with this model [19] (S4 and S5 Figs). However, our observations suggest that although an apoptosis-induced apoptosis mechanism mediated by *eiger* might be involved in promoting cell death in regenerating discs, other signals and mechanisms are also required. Thus, we have found that cell death is not completely abolished in regenerating *eiger* mutant discs, as occurs after cell death induction [20]. In addition, the ectopic activation of *eiger* is not sufficient to induce the high number of “non autonomous” dead cells found in regenerating discs. These data suggest that during regeneration, either there are apoptotic signals that are independent of JNK signalling, or there are additional mechanisms, independent of *eiger*, that trigger JNK signaling. Interestingly, we found that in *eiger* mutant discs, JNK signaling is active, though mostly in the cells around the wound edge. This result implies that during regeneration, the JNK pathway is activated by an alternative way to *Eiger*, at least in some cells. Previous studies have demonstrated that loss of epithelial integrity induces JNK signaling. This might be mediated by proteins like the small GTPase, Rho1, that is known to control epithelial morphogenesis and integrity through its ability to regulate the cytoskeleton, and can promote JNK pathway activity through an interaction with Slpr, an upstream component of the JNK pathway [32]. Thus, the epithelial damage caused by the amputation could initially activate JNK signalling through a mechanism independent of *eiger*, and therefore induce cell death, even in absence of *eiger*. However, the fact that the activity of JNK signalling in *eiger* mutant regenerating discs is mostly restricted to the wound edges, though we found apoptotic cells far away from this site, and that the ectopic activation of JNK signalling is not sufficient to reproduce the strong increase “non-autonomous” cell death observed during disc regeneration, suggests that apoptotic signals independent of JNK signaling are triggered during regeneration. Recently, it has been reported that after inducing cell death or as consequence of the mechanical stress generated during wounding, imaginal disc cells produce reactive oxygen species (ROS) [39]. ROS, either by diffusing from cell to cell or by propagating their production in surrounding cells, function as a paracrine signal that can stimulate the activity of stress-activated protein kinases such as, p38 and JNK stress MAP kinases [39]. Thus, ROS production might result in extensive spreading of apoptotic signals to adjacent cells through activation of these signalling pathways, and likely through other undefined death pathways that may trigger apoptosis independent of JNK signalling. In this scenario, the elimination of *eiger* would not be sufficient to block all the apoptosis during discs regeneration.

Apoptosis-induced proliferation mechanism during disc regeneration

This process seems best suited to aid complete regeneration, since dying cells generate after amputation might promote cell proliferation of the surrounding tissue to restore the tissue lost after damage. The nature of these signaling molecules differs depending on the tissue [12]. Different reports using distinct experimental approaches to study disc regeneration have led to divergent conclusions about the mitogenic signals involved in regeneration [8–7,40–41]. Thus, whereas some authors have proposed that the ortholog of mammalian Wnt, Wingless (Wg) is necessary for imaginal disc regeneration, other authors have showed that Wg is not required for this process [7,21,40–41]. Therefore, the role of apoptosis-induced proliferation and the molecules involved in this process as a compensatory mechanism during disc regeneration remains unresolved. Here we have shown that a partial suppression of cell death during regeneration by over-expressing p35 does not have any measurable effect on cell proliferation during early stages of regeneration. We have also partially inhibited cell death in regenerating discs by down-regulating JNK signalling. Previously, it has been shown that mutations of members of this pathway strongly reduce the number of mitotic cells in regenerating discs [18–19]. Considering the multiple functions of JNK signaling during regeneration [19,27–30], and that the down-regulation of this pathway disrupts wound healing and regeneration in wing discs (see results) [19], the effect on cell proliferation could be indirect and not a consequence of the reduced apoptosis.

In summary our results suggest that apoptosis does not seem to play an important role inducing cell proliferation during regeneration, since partial suppression of cell death does not affect cell proliferation at early stages of regeneration. However, as we have not completely inhibited cell death in regenerating discs, we cannot rule out that programmed cell death contributes to effectively complete disc regeneration.

The variety of processes that take place during regeneration, such as remodelling, migration and, reorganization of epithelia, likely requires the elimination of “unwanted cells”. This could be achieved by the action of different cell death-induced mechanisms that might co-operate during regeneration, increasing the robustness of the process. Then it is possible that the mechanical stress and tissue tensions generated during amputation, in addition to the activation of signaling pathways previously mentioned, also might trigger new unidentified signals to promote apoptosis and/or other mechanisms of programmed cell death, such as autophagy and necroptosis. Functional redundancy of some of these mechanisms could explain the difficulty in completely eliminating cell death during regeneration. This would be consistent with our observations which indicate that the inhibition of only one pro-apoptotic pathway is not sufficient to block cell death during regeneration.

Supporting Information

S1 Fig. Pattern of cell death during wing disc regeneration. (A–D') Third instar wing *en-Gal4 UAS-GFP* discs stained for the apoptotic marker anti-cleaved Caspase-3 (red in A–D, and grey in A'–D'). (A–A') Control discs. (B–B') Regenerating discs at 3 hrs after cut (AC). We only observed dead cells in the wound edge or in the region adjacent. (C–C') Regenerating discs at 6 hrs AC; we observed a significant increase in the number of dead cells in the posterior as well as the anterior compartments. (D–D') 20 hrs AC, we observed a high number of apoptotic cells in the region near to the wound edge, as well as in the anterior compartment. Note the cluster of dead cells in the anterior compartment. Schematic illustrations on the left indicate the cutting lines and the regions eliminated in each disc. (TIF)

S2 Fig. Pattern of cell death during wing disc regeneration. (A-F'') Third instar wing *en-Gal4 UAS-GFP* regenerating discs double staining for the apoptotic marker anti-cleaved Caspase-3 (Blue in A,C, E and F) and DAPI (red in A,C,E and F) at 20hrs AC. (A-B) Regenerating discs at 20 hrs AC; we observed dead cells in the posterior as well as in the anterior compartments. (C-D) Higher magnification of the panels (A-B), note the cluster of dead cells in the anterior compartment. These apoptotic anterior cells, to difference to posterior apoptotic cells, do not express GFP (Arrows). (E-F'') Y-Z projections show a cross-section at the position of the white line in the posterior compartment (E-E'') or the anterior compartment green line (F-F''). We observe Caspase-3 positive cells in the anterior compartment that are integrated in the columnar epithelium (arrowhead in F). Posterior apoptotic cells express GFP (arrow in E). (TIF)

S3 Fig. Pattern of proliferation in *en-Gal4 UAS-GFP nub-Gal4; UAS-DIAP1/+* regenerating discs. (A-B'') Third instar wing discs stained for the mitotic marker Phospho-Histone H3 (blue in A-B, and grey in A''-B'') and anti-Wg (red in A-B, and grey in A''-B'). (A-A'') *en-Gal4 UAS-GFP nub-Gal4; UAS-DIAP1/+* control non-amputated contra-lateral discs. (B-B'') *en-Gal4 UAS-GFP nub-Gal4; UAS-DIAP1/+* regenerating disc at 20 hrs AC. Cell proliferation increases in the posterior compartment of these discs. (C) Bar charts show the average fold change in the mitotic index of control regenerating discs (control), and *en-Gal4 UAS-GFP nub-Gal4; UAS-DIAP1/+* regenerating discs (*nubG4 dIAP1* reg) at 20 hrs AC, compared to control non-regenerating discs. The error bars represent the standard deviation. Schematic illustrations on the left indicate the cutting lines and the regions eliminated in each disc. (TIF)

S4 Fig. Expression of *puc-LacZ* reporter in *eiger³/eiger¹* regenerating discs at 6 hrs AC. (A-A'') Third instar *eiger³/eiger¹; pucLacZ/+* control non-amputated discs. (B-B'') Third instar *pucLacZ/+* amputated discs. (C-C'') *eiger³/eiger¹; puc-LacZ/+* amputated discs. The discs were cultivated during 6 hrs after amputation (see M&M). The discs were stained with phalloidin (red in A-C, and grey A'-C'); and anti- β -Galactosidase (green in A-C and grey in A''-C'') to reveal the pattern of expression of JNK reporter *puc-lacZ*. In *eiger³/eiger¹* mutant discs the expression of the reporter is mostly restricted to the wound edges (compared C-C'' with B-B''). Optical z-sections below the panels showed a cross-section at the position of the white line. Note that to difference to control discs, that have completed the wound healing process (arrows in Optical z-section in B-B') and the epithelial integrity is restored, in *eiger³/eiger¹* mutants the wound is unhealed, and the epithelial is disrupted at the wound site (arrowheads in Optical z-sections C-C''). (TIF)

S5 Fig. Expression of *puc-LacZ* reporter in *eiger³/eiger¹* regenerating discs at 20 hrs AC. (A-A') Third instar *Hh-dsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/ puc-LacZ* non-amputated control discs. (B-B') Third instar *en-Gal4 UAS-GFP/ puc-LacZ* amputated discs. (C-C') *eiger³/eiger¹; Hh-dsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/puc-LacZ/+* amputated discs. The discs were analysed 20 hrs AC. The discs were stained with anti- β -Galactosidase (red in A-C and grey in A'-C') to reveal the pattern of expression of JNK reporter *puc-lacZ*. In *eiger³/eiger¹* mutant discs the expression of the reporter is mostly restricted to the wound edges (compared C with B). (TIF)

S6 Fig. Apoptosis is reduced in *egr¹/egr³* regenerating discs. (A-A'') Third instar *eiger³/eiger¹; Hh-dsRed Ci-Gal4 UAS-GFP/+* discs wing stained for the apoptotic marker anti-cleaved Caspase-3 (blue in A and A'', and grey in A') and anti-Wg (red in A and A''), at 20 hrs AC. (TIF)

S7 Fig. Expression of Wg in regenerating *en-Gal4 UAS-puc UAS-GFP/+* discs 20 hrs AC. (A-C") Expression of Wg, stained with anti-Wg (red in A-C, and grey A'-C") in control third instar non amputated discs (A-A"), control amputated discs (B-B") and *en-Gal4 UAS-puc UAS-GFP/+* regenerating discs at 20 hrs AC (C-C"). (C-C") In *en-Gal4 UAS-puc UAS-GFP/+* regenerating discs 20 hrs AC the expression of Wg does not disappears at the d/v boundary as it occurs in control regenerating discs (B-B"). (TIF)

S8 Fig. Apoptotic pattern in *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* regenerating discs. (A-B') Discs stained for the apoptotic marker anti-cleaved Caspase-3 (red in A-B, and grey in A'-B'). (A-A') Control *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* non-amputated discs. (B-B') *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* regenerating discs at 20 hrs AC. We observed that cell dead in reduced compared to control regenerating discs (compared to [Fig 1](#)). (TIF)

S9 Fig. Regenerated adult *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* wings. (A) Different examples of adult regenerated *en-Gal4 nub-Gal4 UAS-p35 UAS-GFP/+* wings, and control contralateral wings (lower wings, Wt). The discs were amputated at different times during development. Depending on the size of the fragment amputated and time passed BPF (left) we observed a range of regenerated adult wing phenotypes. (TIF)

Acknowledgments

We thank Jose Felis de Celis, and Carlos Estella for providing reagents and useful discussion. William McGinnis, Carlos Estella, Scott Lindsay and Luis Alberto Baena for helping to improve the manuscript. We are very grateful to Gines Morata, Hermann Steller, the Bloomington Stock Center and the Developmental Studies Hybridoma Bank for providing fly strains and antibodies.

Author Contributions

Conceptualization: SDG AB.

Formal analysis: SDG AB.

Funding acquisition: AB.

Investigation: SDG SA.

Methodology: SDG AB.

Project administration: AB.

Supervision: SDG AB.

Visualization: SDG SA AB.

Writing – original draft: AB.

Writing – review & editing: SDG SA AB.

References

1. Bergantinos C., Vilana X., Corominas M., and Serras F. Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology. *Bioessays*. 2010; 32: 207–217. doi: [10.1002/bies.200900105](https://doi.org/10.1002/bies.200900105) PMID: [20127699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20127699/)

2. Hadorn E., Anders G., and Ursprung H. Combination derived from partial dissociated imaginal disks of various mutants and types of *Drosophila*. *J Exp Zool*. 1959; 142: 159–175. PMID: [13710352](#)
3. Hadorn E., and Buck D. Ueber Entwicklungsleistungen transplanterter teilstücke von Flügel-Imaginalschiben von *Drosophila melanogaster*. *Rev. Suisse Zool*. 1962; 69: 302–310.
4. Hadorn E., Hurlimann R., Mindek G., Schubiger G., and Staub M. [Developmental capacity of embryonal blastema in *Drosophila* following cultivation in an adult host]. *Rev Suisse Zool*. 1968; 75: 557–569. PMID: [5730076](#)
5. Bryant P.J. Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 1971; 26: 637–651. PMID: [5002603](#)
6. Schubiger G. Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 1971; 26: 277–295. PMID: [5003476](#)
7. Smith-Bolton R.K., Worley M.I., Kanda H., and Hariharan I.K. Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. *Dev Cell*. 2009; 16: 797–809. doi: [10.1016/j.devcel.2009.04.015](#) PMID: [19531351](#)
8. Bergantinos C., Corominas M., and Serras F. Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development*. 2010; 137: 1169–1179. doi: [10.1242/dev.045559](#) PMID: [20215351](#)
9. Sun G., and Irvine K.D.. Control of growth during regeneration. *Curr Top Dev Biol*. 2014; 108: 95–120. doi: [10.1016/B978-0-12-391498-9.00003-6](#) PMID: [24512707](#)
10. Worley M.I., Setiawan L., and Hariharan I.K. Regeneration and transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Annu Rev Genet*. 2012; 46: 289–310. doi: [10.1146/annurev-genet-110711-155637](#) PMID: [22934642](#)
11. Bergmann A., and Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal* 2010; 3: re8. doi: [10.1126/scisignal.3145re8](#) PMID: [20978240](#)
12. Perez-Garijo A., and Steller H.. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*. 2015; 142: 3253–3262. doi: [10.1242/dev.127878](#) PMID: [26443630](#)
13. Vríz S., Reiter S., and Galliot B. Cell death: a program to regenerate. *Curr Top Dev Biol*. 2014; 108: 121–151. doi: [10.1016/B978-0-12-391498-9.00002-4](#) PMID: [24512708](#)
14. Chera S., Ghila L., Dobretz K., Wenger Y., Bauer C., Buzgariu W., et al. Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev Cell*. 2009; 17: 279–289. doi: [10.1016/j.devcel.2009.07.014](#) PMID: [19686688](#)
15. Tseng A.S., Adams D.S., Qiu D., Koustubhan P., and Levin M. Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*. 2007; 301: 62–69. doi: [10.1016/j.ydbio.2006.10.048](#) PMID: [17150209](#)
16. Jung Y., Witek R.P., Syn W.K., Choi S.S., Omenetti A., Premont R., et al. Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors. *Gut*. 2010; 59: 655–665. doi: [10.1136/gut.2009.204354](#) PMID: [20427400](#)
17. Li F., Huang Q., Chen J., Peng Y., Roop D.R., Bedford J.S., and Li C.Y. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal*. 2010; 3: ra13. doi: [10.1126/scisignal.2000634](#) PMID: [20179271](#)
18. Bosch M., Baguna J., and Serras F. Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs. *Int J Dev Biol*. 2008; 52: 1043–1050. doi: [10.1387/jfdb.082608mb](#) PMID: [18956337](#)
19. Bosch M., Serras F., Martin-Blanco E., and Baguna J. JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol*. 2005; 280: 73–86. doi: [10.1016/j.ydbio.2005.01.002](#) PMID: [15766749](#)
20. Perez-Garijo A., Fuchs Y., and Steller H. Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. *Elife*. 2013; 2: e01004. doi: [10.7554/eLife.01004](#) PMID: [24066226](#)
21. Diaz-Garcia S., and Baonza A. Pattern reorganization occurs independently of cell division during *Drosophila* wing disc regeneration in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 13032–13037. doi: [10.1073/pnas.1220543110](#) PMID: [23878228](#)
22. Adachi-Yamada T., Fujimura-Kamada K., Nishida Y., & Matsumoto K. Distorsion of proximo distal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature*. 1999; 400: 166–169. doi: [10.1038/22112](#) PMID: [10408443](#)
23. Martín-Blanco E., Gampel A., Ring J., Virdee K., Kirov N., Tol-kovsky A. M. et al. Puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev*. 1998; 12: 557–57 PMID: [9472024](#)

24. Ryoo H.D., Bergmann A., Gonen H., Ciechanover A., and Steller H. Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and *ubcD1*. *Nat Cell Biol.* 2002; 4: 432–8. doi: [10.1038/ncb795](https://doi.org/10.1038/ncb795) PMID: [12021769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12021769/)
25. Moreno E, Yan M, Basler K (2002) Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol* 12: 1263–1268. PMID: [12176339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12176339/)
26. Aldaz S., Escudero L.M., and Freeman M. Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 14217–14222. doi: [10.1073/pnas.1008623107](https://doi.org/10.1073/pnas.1008623107) PMID: [20660765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20660765/)
27. Galko M.J., and Krasnow M.A. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol.* 2004; 2: E239. doi: [10.1371/journal.pbio.0020239](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020239) PMID: [15269788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15269788/)
28. Ramet M., Lanot R., Zachary D., and Manfrulli P. JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol.* 2002; 241: 145–156. doi: [10.1006/dbio.2001.0502](https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0502) PMID: [11784101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11784101/)
29. Lee N., Maurange C., Ringrose L., and Paro R. Suppression of Polycomb group proteins by JNK signaling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature.* 2005; 438: 234–237. doi: [10.1038/nature04120](https://doi.org/10.1038/nature04120) PMID: [16281037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16281037/)
30. Mattila J., Omelyanchuk L., Kytälä S., Turunen H., and Nokkala S. Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Int J Dev Biol.* 2005; 49: 391–399. doi: [10.1387/ijdb.052006jm](https://doi.org/10.1387/ijdb.052006jm) PMID: [15968584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15968584/)
31. Igaki T. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis.* 2009; 14: 1021–1028. doi: [10.1007/s10495-009-0361-7](https://doi.org/10.1007/s10495-009-0361-7) PMID: [19466550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19466550/)
32. Neisch A.L., Speck O., Stronach B., and Fehon R.G. Rho1 regulates apoptosis via activation of the JNK signaling pathway at the plasma membrane. *J Cell Biol* 2010 189, 311–323. doi: [10.1083/jcb.200912010](https://doi.org/10.1083/jcb.200912010) PMID: [20404112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20404112/)
33. Khoo P., Allan K., Willoughby L., Brumby A.M., and Richardson H.E. In *Drosophila*, RhoGEF2 cooperates with activated Ras in tumorigenesis through a pathway involving Rho1-Rok-Myosin-II and JNK signaling. *Dis Model Mech* 2013 6, 661–678. doi: [10.1242/dmm.010066](https://doi.org/10.1242/dmm.010066) PMID: [23324326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23324326/)
34. Glise B., Bourbon H., and Noselli S. *hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell.* 1995; 83: 451–461. PMID: [8521475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8521475/)
35. Hay B.A., Wolff T., and Rubin G.M. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development.* 1994; 120: 2121–2129. PMID: [7925015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7925015/)
36. Huh J.R., Guo M., and Hay B.A. Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol.* 2004; 14: 1262–1266. doi: [10.1016/j.cub.2004.06.015](https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.015) PMID: [15268856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15268856/)
37. Perez-Garijo A., Martin F.A., and Morata G. Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development.* 2004; 131: 5591–5598. doi: [10.1242/dev.01432](https://doi.org/10.1242/dev.01432) PMID: [15496444](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15496444/)
38. Ryoo H.D., Gorenc T., and Steller H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell.* 2004; 7: 491–501. doi: [10.1016/j.devcel.2004.08.019](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.019) PMID: [15469838](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15469838/)
39. Santabarbara-Ruiz P., Lopez-Santillan M., Martinez-Rodriguez I., Binagui-Casas A., Perez L., Milan M., et al. ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during *Drosophila* Regeneration. *PLoS Genet.* 2015; 11: e1005595. doi: [10.1371/journal.pgen.1005595](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005595) PMID: [26496642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26496642/)
40. Herrera S.C., Martin R., and Morata G. Tissue homeostasis in the wing disc of *Drosophila melanogaster*: immediate response to massive damage during development. *PLoS Genet.* 2013; 9: e1003446. doi: [10.1371/journal.pgen.1003446](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003446) PMID: [23633961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23633961/)
41. Harris R.E., Setiawan L., Saul J., and Hariharan I.K. Localized epigenetic silencing of a damage-activated WNT enhancer limits regeneration in mature *Drosophila* imaginal discs. *Elife.* 2016; 5.